

# **Funktionelle Untersuchungen von Ahnak durch Protein-Protein-Wechselwirkungen und in Ahnak-Defizienzmodellen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r   r e r u m   n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin



von

Diplom-Biologin Daria Petzhold

Geboren am 20. Januar 1972, in Hamburg

Dekan: Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter/innen: 1: Prof. Dr. Andreas Herrmann  
2: Prof. Dr. Ingo Morano  
3: Prof. Dr. Vera Regitz-Zagrosek

eingereicht: 04.04.2007

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2007

---

## Zusammenfassung

Ahnak ist ein ubiquitäres Protein, das an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt ist. In der Herzmuskelzelle ist Ahnak überwiegend am Sarkolemma lokalisiert und bindet an Aktin und an die regulatorischen  $\beta 2$ -Untereinheit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. Das Ziel dieser Arbeit war die Funktion von Ahnak im Herzen mit Hilfe eines Knock-out-Maus-Modells und in Bindungsstudien zu untersuchen.

Morphologische Untersuchungen zeigten, dass das Längenwachstum adulter Kardiomyozyten bei Ahnakdefizienz signifikant reduziert war. Die Kontraktionseigenschaften adulter isolierter Ahnak-defizienter Kardiomyozyten (im Alter von 6 Monaten) waren ebenfalls verändert. Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten waren erhöht. Eine Erhöhung des diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels zeigten die Kardiomyozyten schon im Alter von 3 Monaten. Diese beobachteten phänotypischen Veränderungen lassen vermuten, dass die Aktivität des L-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals erhöht ist.

In dieser Arbeit konnte das PXXP-Motiv, in der C-terminalen Ahnak-Domäne, als die hochaffine  $\beta 2$ -Bindungsstelle ( $K_D \sim 60 \text{ nM}$ ) identifiziert werden. Substitution von Prolin gegen Alanin verringerte zwar die Bindung zur  $\beta 2$ -Untereinheit dramatisch ( $K_D \sim 1 \mu\text{M}$ ), hob sie aber nicht auf.

In weiteren Bindungsstudien zeigte sich, dass die natürlich vorkommende Missensmutation I5236T die Bindung zur regulatorischen  $\beta 2$ -Untereinheit verstärkte, dagegen verminderte die PKA-abhängige Phosphorylierung der beiden Proteinpartner die Bindung.

Experimente am ganzen isoliert perfundierten Herzen zeigten, dass Ahnak-Knock-Out-Herzen geringer  $\beta$ -adrenerg stimulierbar waren. Ahnak scheint wie eine physiologische Bremse des kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals zu wirken.

### Schlagwörter:

Ahnak, Ahnak-Knock-Out-Maus,  $\beta$ -adrenerge Stimulierung,  $\beta 2$  Untereinheit,  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient, elektromechanische Kopplung, Kardiomyozyten, L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, Missensmutationen, Proteinbindungen, PXXP-Motiv, PKA-abhängige Phosphorylierung

---

## Abstract

Ahnak is an ubiquitous protein with a unique structure, which has been implicated in cell type specific functions. In cardiomyocytes, ahnak is predominantly localized at the sarcolemma and is associated with actin and with the regulatory  $\beta 2$  subunit of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel. The aim of this work was to unravel the function of ahnak in the heart, using a knock-out-mouse model and binding studies.

Morphological studies showed a significant decrease in the cell-length of ahnak deficient cardiomyocytes. The contractile parameters of isolated adult ahnak deficient cardiomyocytes (in the age of 6 month) were altered. The development of tension and relaxation were increased. An increase of diastolic calcium was already observed at the age of 3 month. In general the observed phenotypic changes suggested an increased activity of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channel.

In this study, a PXXP-motif, which locates in ahnaks C-terminus, was identified as the high affinity  $\beta 2$  subunit binding site ( $K_D \sim 60 \text{ nM}$ ). Substitution of both proline residues by alanine reduced, but did not abolish the binding ( $K_D \sim 1 \mu\text{M}$ ).

Further binding studies revealed that the natural occurring ahnak missense mutation I5236T increases the binding affinity to the regulatory  $\beta 2$  subunit. By contrast PKA dependant phosphorylation of both protein partners decreases the interaction.

In studies with isolated perfused working heart preparations, the ahnak deficient hearts were less  $\beta$ -adrenergic stimulated than hearts from wild type. Taken together ahnak seems to be a physiological brake of the cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  channel.

### Keywords:

Ahnak, Ahnak-knock-out-mouse,  $\beta$ -adrenergic stimulation,  $\beta 2$  subunit,  $\text{Ca}^{2+}$ -transient, excitation-contraction-coupling, cardiomyocyte, L-type- $\text{Ca}^{2+}$ -channel, missense mutation, protein binding, PXXP-motif, PKA-dependant phosphorylation

---

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>Zusammenfassung .....</u></b>	<b><u>ii</u></b>
<b><u>Abstract .....</u></b>	<b><u>iii</u></b>
<b><u>Abkürzungsverzeichnis .....</u></b>	<b><u>viii</u></b>
<b><u>1. Einleitung .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b>1.1 Aufbau der Kardiomyozyten .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die Membransysteme der Kardiomyozyten .....	1
1.1.2 Der kontraktile Apparat von Kardiomyozyten .....	2
<b>1.2 Elektromechanische Kopplung .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Querbrücken-Zyklus .....	6
1.2.2 Das vegetative Nervensystem reguliert die elektromechanische Kopplung ..	7
<b>1.3 Der kardiale L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Struktur des kardialen L-Typ-Ca <sup>2+</sup> -Kanals .....	10
1.3.2 Die $\beta$ 2-Untereinheit reguliert den kardialen L-Typ-Ca <sup>2+</sup> -Kanal .....	12
<b>1.4 Ahnak erhält die Zellstruktur und reguliert den L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanal .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Fragestellung .....</b>	<b>20</b>
<b><u>2. Material und Methoden .....</u></b>	<b><u>23</u></b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Chemikalien .....	23
2.1.2 Oligonukleotide .....	23
2.1.3 Puffer und Stammlösungen .....	25
2.1.4 Bakterienstämme .....	25
2.1.5 Art und Herkunft der kultivierten Zellen .....	26
2.1.6 Klonierungsvektoren .....	26
<b>2.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>27</b>
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion .....	27
2.2.2 Aufklärung der Gensequenz durch Gen-Bibliotheken-Screening .....	27
2.2.3 Sequenzierung der DNA .....	28
2.2.4 Primer-Design .....	29

---

2.2.5	Herstellung des Target-Konstruktes .....	30
2.2.6	Klonierung des Target-Konstruktes .....	31
2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten .....	32
2.2.8	Transformation .....	32
2.2.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	33
2.2.10	Restriktionsanalyse.....	33
2.2.11	Gelelektrophorese .....	34
2.2.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	35
2.2.13	Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse der DNA .....	35
<b>2.3</b>	<b>Zellkultur-Methoden.....</b>	<b>36</b>
2.3.1	Medien für die Kultur von ES-Zellen.....	36
2.3.2	Kultivierung von ES-Zellen .....	37
2.3.3	Präparation embryonaler Fibroblasten .....	37
2.3.4	Elektroporation und Selektion von ES-Zellen .....	38
2.3.5	Isolierung der ES-Zellen.....	39
2.3.6	Screening der ES-Zellen .....	39
2.3.7	Proliferationstest mit ES-Zellen .....	40
2.3.8	Isolation adulter Kardiomyozyten .....	41
<b>2.4</b>	<b>Untersuchung der Kontraktion und des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Transienten</b> .....	<b>42</b>
<b>2.5</b>	<b>Working-Heart-Methode .....</b>	<b>42</b>
<b>2.6</b>	<b>Mutations-Screening.....</b>	<b>46</b>
2.6.1	Mutagenese.....	47
2.6.2	Klonierung der GST-Fusionsproteine .....	49
2.6.3	Klonierung der His-Tag-Fusionsproteine .....	49
2.6.4	Expression von GST- und His-Tag-Fusionsproteinen .....	50
2.6.5	Isolierung und Reinigung der Fusionsproteine .....	51
2.6.6	Phosphorylierung der Fusionsproteine .....	52
2.6.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Transfer .....	52
2.6.8	Immunofärbung der Proteine nach dem Western-Transfer .....	53
<b>2.7</b>	<b>Ultrazentrifugation .....</b>	<b>54</b>
<b>2.8</b>	<b>Bindungsstudien mit BIAcore.....</b>	<b>55</b>
<b>2.9</b>	<b>Statistische Auswertungen .....</b>	<b>57</b>

---

---

<b><u>3. Ergebnisse .....</u></b>	<b><u>58</u></b>
<b>3.1 Ahnak-Defizienzmodelle .....</b>	<b>58</b>
3.1.1 Genstruktur .....	58
3.1.2 Erzeugung des Ahnak-Target-Konstruktes .....	60
3.1.3 Charakterisierung des Target-Konstruktes .....	62
3.1.4 Testung des Target-Konstruktes durch Restriktionshydrolyse .....	62
3.1.5 ES-Zellen-Screening .....	63
3.1.6 Proliferation der ES-Zellen .....	64
3.1.7 Phänotypisierung der Ahnak-Knock-Out-Mäuse .....	66
3.1.8 Morphologische Untersuchungen adulter Kardiomyozyten von Ahnak- Wildtyp- und Ahnak-Knock-Out-Mäusen .....	67
3.1.9 Einzelzell-Messungen adulter Kardiomyozyten vom Ahnak-Wildtyp und Ahnak-Knock-Out .....	69
3.1.10 Vergleich der aktiven und passiven Kontraktionseigenschaften von Ahnak- Wildtyp- und Ahnak-Knock-Out-Herzen .....	78
<b>3.2 Identifizierung natürlich vorkommender Ahnak-Mutationen .....</b>	<b>82</b>
3.2.1 Fusionsproteine von Ahnak .....	82
3.2.2 Die Ahnak-Mutationen Ahnak-C1 I5236T und Ahnak-C1/C I5236T verstärken die Bindung mit der $\beta 2$ -Untereinheit des $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals .....	86
3.2.3 Die Mutation T5549M im Ahnak-P3-P4-Fragment beeinflusst die Interaktion zur $\beta 2$ -Untereinheit des $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals nicht .....	90
3.2.4 Das PxxP-Motiv, in der C-terminalen Ahnak-Domäne, ist eine wichtige Bindungsstelle zur $\beta 2$ -Untereinheit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals .....	91
3.2.5 Die Bindung von Ahnak-C1-WT und Ahnak-C1 I5236T wird durch PKA- Phosphorylierung abgeschwächt .....	93
<b><u>4. Diskussion .....</u></b>	<b><u>94</u></b>
<b><u>5. Zusammenfassung .....</u></b>	<b><u>104</u></b>
<b><u>6. Literaturverzeichnis .....</u></b>	<b><u>106</u></b>
<b><u>7. Anhang .....</u></b>	<b><u>114</u></b>
7.1 Gen-Bibliotheken-Pool .....	114
7.2 Expressionsvektoren .....	117

---

---

<b>7.3 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen .....</b>	<b>119</b>
<b><u>Danksagung.....</u></b>	<b><u>127</u></b>
<b><u>Lebenslauf .....</u></b>	<b><u>128</u></b>
<b><u>Publikationen.....</u></b>	<b><u>129</u></b>
<b><u>Erklärung .....</u></b>	<b><u>130</u></b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosinmonophosphat
AID	$\alpha$ -Interaktions-Domäne
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BID	$\beta$ -Interaktions-Domäne
bp	Basenpaare
bpm	Schläge pro Minute
BSA	Rinderserum-Albumin
C	Cytosin
C-	Carboxy-
cAMP	zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat
cDNA	copy-DNA
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
+dP/dt max.	maximale Kontraktionsgeschwindigkeit
-dP/dt max.	maximale Relaxationsgeschwindigkeit
+dR/dt max.	maximale Geschwindigkeit des Fura-2-Fluoressenzsignal-Anstiegs
-dR/dt max.	maximale Geschwindigkeit der Fura-2-Fluoressenzsignal-Abnahme
dsDNA	doppelsträngige DNA
+ds/dt max.	maximale Relaxationsgeschwindigkeit der Zellverkürzung
-ds/dt max.	maximale Kontraktionsgeschwindigkeit der Zellverkürzung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Dinatriumsalz
EMK	elektromechanische Kopplung
ES	embryonale Stammzellen



---

EST	Expressed Sequence Tag
et al.	und andere
fw	vorwärts
G	Guanin
Geschw.	Geschwindigkeit
GK	Guanylatkinase
GST	Glutathion-S-Transferase
Hepes	4 (2-hydroxyethyl)-Säure 1-piperazineethanesulfonic
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -D-galactopyranosid
IC	intrakardialer
Iso	Isoprenalin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
$K_d$	Dissoziationskonstante
KO	Knock-Out
L-	Long-Lasting
MAGUK's	membranassoziierte Guanylatkinase-Familie
max.	maximale
mRNA	messenger-RNA
$\mu\text{m/s}$	Mikrometer pro Sekunde, Verkürzungseinheit
N	Anzahl
N-	Amino-
NCX	$\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher
neo	Neomycin
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymeraseketten-Reaktion
$\text{P}_i$	Phosphatrest

---

PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
PKA	Proteinkinase-A
PNS	Positiv-Negativ-Selektion
PLB	Phospholamban
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RyR	Ryanodinrezeptor
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin-Charlottenburg, Deutschland
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of Mean
SERCA	sarkoplasmatische Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SH <sub>3</sub>	Src-Homologie-Domäne
siRNA	small interfering RNA
SOC	Derivat von SOB (super optimal broth)
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SPR	Surface Plasmon Resonanz
SSCP	Single-Strand Conformational Polymorphism
T	Thymin
T-	transversal
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tk	Thymidinkinase
Tm	Tropomyosin
Tn	Troponin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

---

---

tRNA	transfer-RNA
U	units
UV	Ultraviolettes Licht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosidase

## 1. Einleitung

Durch die Kontraktion des Herzens wird Blut in das Kreislaufsystem gepumpt, das die Organe mit allen lebensnotwendigen Bestandteilen (Sauerstoff, Aminosäuren, Lipiden, Ionen etc.) versorgt. Schon Sydney Ringer erkannte vor über 120 Jahren die bedeutende Rolle des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  für die Herzkontraktion. Er konnte zeigen, dass das isoliert perfundierte Herz nicht ohne  $\text{Ca}^{2+}$  in der Perfusionslösung fähig war zu schlagen (Ringer, 1883).

### 1.1 Aufbau der Kardiomyozyten

#### 1.1.1 Die Membransysteme der Kardiomyozyten

Wichtige Membranstrukturen sind die Kernmembran und das Sarkolemma, die den Nukleus bzw. das Zytosol vom extrazellulären Raum trennt. Transverse (T) Tubuli, Einstülpungen der Plasmamembran, die sich tief ins Innere der Kardiomyozyten erstrecken, spielen eine wichtige Rolle bei der elektromechanischen Kopplung. Ein großer Teil des Zellvolumens wird von Mitochondrien und dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) eingenommen. Das kardiale SR besteht aus zwei Regionen. Das sarkotubuläre Netzwerk (sog. longitudinales SR) ist für die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  notwendig. Dagegen bilden die subsarkolemmalen Zisternen (sog. Terminalzisternen) spezifische Kontaktstrukturen mit den T-Tubuli, die sogenannten Diaden. Die beiden Membransysteme fusionieren nicht und lassen einen kleinen Spalt frei, der mit elektronendichten Strukturen, den „Feet“ belegt ist. Die Feet stellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle (Ryanodinrezeptoren) im SR und L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (L, Long-Lasting) bzw. den Dihydropyridinrezeptor (DHPR) im T-Tubulus dar.

### 1.1.2 Der kontraktile Apparat von Kardiomyozyten

Kardiomyozyten besitzen eine große Anzahl Myofibrillen, die im Polarisationsmikroskop als, in Serie geschalteten, Querstreifen, den hellen I-Banden und dunklen A-Banden, erscheinen. Im Zentrum der A-Bande befindet sich die M-Linie, während die I-Bande durch Z-Scheiben halbiert wird. Die Z-Scheiben begrenzen die morphologische Einheit der Myofibrillen, das Sarkomer. Jedes Sarkomer ist in Ruhe, je nach Muskeltyp, ca. 2-2,5  $\mu\text{m}$  lang. Die unterschiedliche Lichtbrechung im Polarisationsmikroskop entsteht durch die Überlappung dünner und dicker Filamente im Sarkomer. Die dicken Filamente sind etwa 1,6  $\mu\text{m}$  lang und 100 nm dick und bestehen hauptsächlich aus Myosin und regulatorischen Proteinen. Sie sind im Sarkomer an der M-Linie fixiert. Die dünnen Filamente bestehen im wesentlichen aus Aktin und den regulatorischen Proteinen Tropomyosin und Troponin. Sie sind etwa 1  $\mu\text{m}$  lang und 50 nm dick und sind in der Z-Linie verankert (Abb. 1.1),(Lodish, 2001).

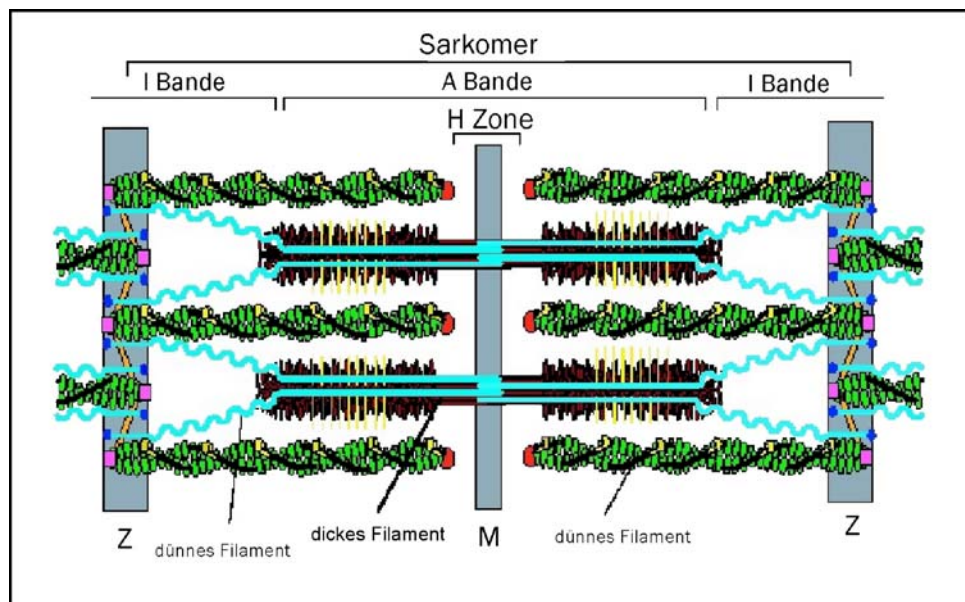


Abb.1.1: Schematische Darstellung eines Sarkomers. Aktin (grün), Myosin (rot), regulatorische Proteine Tropomyosin und Troponin (schwarze Linien). Die dünnen Filamente sind über  $\alpha$ -Aktinin (orange) mit der Z-Scheibe verankert. Die dicken Filamente sind über Titin (türkis) mit der Z-Scheibe

verbunden. CapZ (pinkfarbene Rechtecke), Tropomodulin (leuchtend rot), Myosin Bindungsprotein C (gelbe Längsstreifen), (Gregorio, 2000).

Sarkomerproteine, wie  $\alpha$ -Aktinin, CapZ, Nebulette, Tropomodulin und Titin, sind nicht direkt am Kontraktionsprozess beteiligt, erhalten aber die Struktur des Sarkomers. Sie bilden mechanische Verbindungen, die die Spannungsentwicklung der kontraktilen Proteine zu benachbarten Sarkomeren fördert und letztendlich zu den Enden des Muskels (Schiaffino, 1996). Die Enden der dünnen Filamente werden über die Proteine  $\alpha$ -Aktinin und CapZ ( $\beta$ -Aktinin) in der Z-Scheibe verankert. Nebulette (homolog zum Protein Nebulin, das im Skelettmuskel vorkommt) befindet sich entlang der Achsen der dünnen Filamente und reicht von der Z-Scheibe bis in die I-Bande hinein. An den Enden der dünnen Filamente ist das Capping-Protein Tropomodulin gebunden (Gregorio, 2000).

Titin, das auch Connectin genannt wird, ist eines der größten bekannten Proteine in Vertebraten und hat ein Molekulargewicht von 3000-3700 kDa. Es erstreckt sich von der Z-Scheibe bis zum Zentrum (M-Linie) des Sarkomers. Zum Einen zentriert Titin die dicken Filamente im Sarkomer, zum Anderen besitzt es elastische Regionen innerhalb der I-Bande (Gregorio, 2000).

### 1.2 Elektromechanische Kopplung

Die elektromechanische Kopplung (EMK) beschreibt die Vorgänge von der Auslösung eines Aktionspotentials einer Muskelzelle bis zu ihrer Kontraktion.

Jeder Herzschlag wird durch einen elektrischen Impuls initiiert. Die elektrische Erregung beginnt im Sinusknoten und breitet sich innerhalb von etwa 100 ms über die Vorhöfe aus. Die weitere Erregung im

Atrioventrikularknoten wird zunächst mit einer Verzögerung von etwa 90 ms über die His-Bündel weitergeleitet. Diese leiten die Erregung schnell (100 ms) zum Ventrikelmuskel weiter (Rubart, 2005). Ein Aktionspotential im Herzen hat eine Gesamtdauer von ca. 200-400 ms.

Das Ruhepotential liegt bei ca.  $-90$  mV. Während des kardialen Aktionspotentials öffnen sich die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und erreichen einen Overshoot von  $+40$  mV, oder mehr. Extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  fließt über den spannungsabhängigen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (DHPR) in die Zelle und löst die Freisetzung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch den Ryanodinrezeptor (RyR) ( $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung) aus und erhöht die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $0,1$   $\mu\text{M}$  auf etwa  $5$   $\mu\text{M}$ . (Abb. 1.2). Mit dem erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom steigt die Kontraktionskraft (Systole).

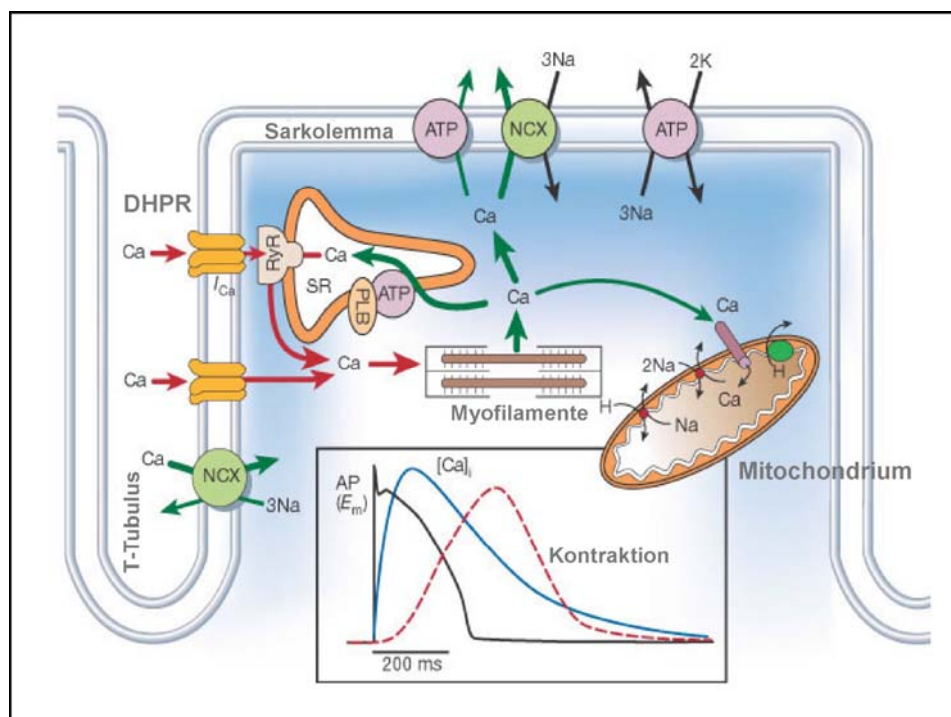


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes in einer ventrikulären Myozyte. Die Insertfigur zeigt den Zeitverlauf eines Aktionspotentials, die damit verbundene Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und die daraus resultierende und gemessene Kontraktion in einer Herzzelle. NCX,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher; ATP, ATPase; PLB, Phospholamban; SR, sarkoplasmatisches Retikulum; RyR, Ryanodinrezeptor; DHPR, Dihydropyridinrezeptor (Bers, 2002).

Abbildung 1.3 zeigt die strukturellen Untereinheiten des Aktin-Filamentes während der Diastole und Systole im Herzmuskel. Helikal angeordnetes Aktin (A) bildet das Rückgrat des dünnen Filamentes mit den regulatorischen Proteinen Tropomyosin (Tm) und Troponin (Tn), die in einem Verhältnis von 7:1:1 (A:Tm:Tn) assoziiert sind. Tropomyosin ist ein flexibles, stäbchenförmiges Strukturprotein mit einer Länge von ca. 40 nm. Es bindet sieben Aktinmonomere, wobei sich die benachbarten Tm überlappen (Solaro, 1996). Troponin ist ein Komplex aus drei Polypeptiden, Troponin- T, I und C. TnI, die inhibitorische Untereinheit, ist in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  mit Aktin, TnC, der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Untereinheit, und TnT verbunden. Zusätzlich bindet TnT an Tropomyosin (Solaro, 1996).

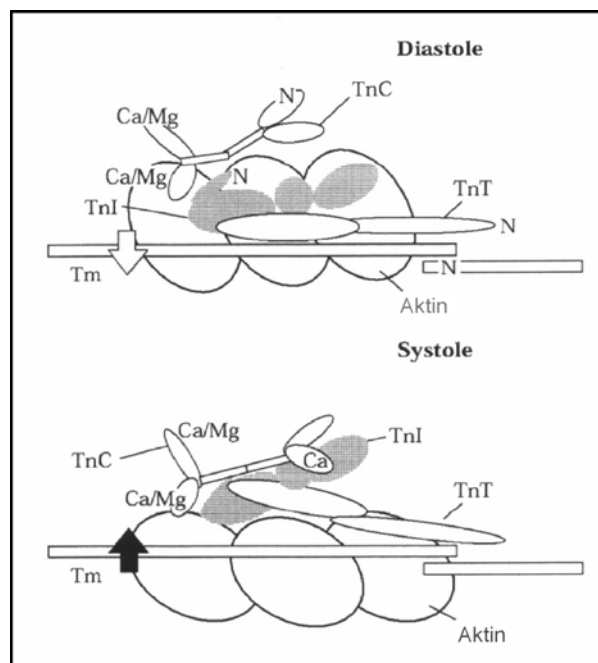


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der funktionellen Untereinheiten des Aktin-Filamentes. N, N-terminale Domäne; Tn, Troponin; TnT, tropomyosin-bindende Untereinheit von Tn; TnI, inhibitorische Untereinheit von Tn; TnC,  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Untereinheit von Tn (Solaro, 1996).

Während der Systole binden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an die N-terminale Region der TnC-Untereinheit und verändert die TnC-Konformation erheblich. Dadurch verstärkt sich die TnC-TnI-Interaktion, während die TnI-Aktin-Bindung schwächer wird. Durch diese Konformationsänderung des Troponinkomplexes verändert auch Tm seine Position auf dem



Aktinfilament, so dass krafterzeugende Aktin-Myosin-Interaktionen möglich werden (Solaro, 1996; Vibert, 1997).

Die Erniedrigung der myoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der Diastole erfolgt über vier Mechanismen: die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (sie entfernt über zwei Drittel des  $\text{Ca}^{2+}$ ), der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher im Sarkolemma (entfernt etwa ein Drittel des  $\text{Ca}^{2+}$ ), die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im Sarkolemma und die Aufnahme in die Mitochondrien (entfernen das restliche  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Cytosol), siehe Abb. 1.2 (Bers, 2002). Dies führt zur Relaxation der Zelle.

### 1.2.1 Querbrücken-Zyklus

Die Muskelkontraktion wird durch zyklische Interaktion der Motordomäne des Typ-II-Myosins mit einem benachbarten Aktinfilament erzeugt, die nach Anheftung und Konformationsveränderung ihrer Halsdomäne Kraft und Sarkomerverkürzung auslöst (Geeves, 1999). Während der Verkürzung des Sarkomers verändern die dünnen und dicken Filamente nicht ihre Länge, sondern gleiten ineinander und verkürzen das Sarkomer (Gleitfilament-Hypothese) (Huxley, 1959). Die notwendige Energie wird durch die hydrolytische Spaltung von ATP durch die ATPase des Myosins bereitgestellt, (Abb. 1.4) (Gordon, 2001). Der Wechsel zwischen schwacher, nicht-krafterzeugender Bindung (geringe Affinität) und starker, krafterzeugender Bindung (hohe Affinität) des Myosins am Aktin, ist mit der Freisetzung von  $\text{P}_i$  gekoppelt (Brenner, 1988; Dantzig, 1992).

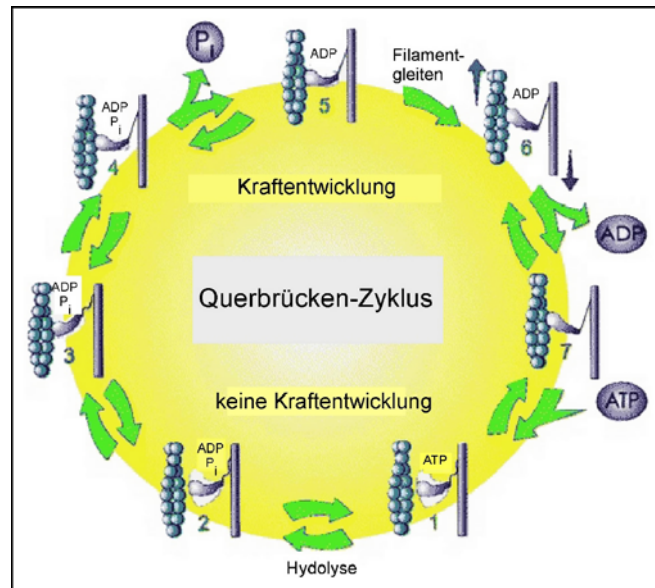


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Querbrücken-Zyklus. Dunkle Pfeile bedeuten Bewegung. Im entspannten Muskel ist das Myosinköpfchen nicht an Aktin gebunden und ATP wird in eng gebundenes ADP und  $P_i$  hydrolysiert (Schritt 1 und 2). In Schritt 3 und 4 bindet das Myosinköpfchen zunächst schwach, in einem nicht-krafterzeugenden Zustand, an Aktin. Nach Freisetzung des  $P_i$ , das immer noch am Myosinköpfchen gebunden ist, geht das Myosinköpfchen in einen krafterzeugenden Zustand über. Nun können die Filamente ineinander gleiten und das Sarkomer sich verkürzen (Schritt 5 und 6). Anschließend wird ADP freigesetzt und durch ATP ersetzt (Schritt 7). Daraufhin löst sich das Myosinköpfchen vom Aktin (Schritt 1) und der Zyklus kann von Neuem beginnen (Goldman, 1998).

### 1.2.2 Das vegetative Nervensystem reguliert die elektromechanische Kopplung

Noradrenalin (NA), der Neurotransmitter des Sympathikus, wirkt stimulierend auf die Herzaktivität und erhöht die Kraftentwicklung sowie die Kontraktions- und Erschlaffungsgeschwindigkeit. Durch Bindung von Noradrenalin an seinen  $\beta$ -adrenergen Rezeptor wird eine GTP-bindendes Protein ( $G_s$ ) aktiviert, das eine Erhöhung der Adenylatzyklase-Aktivität auslöst. Es wird dadurch vermehrt zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP) aus ATP gebildet. Dies aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase-A (PKA), welche eine Fülle intrazellulärer Proteine (z.B. Phospholamban,  $\alpha_1$ - und  $\beta_2$ -Untereinheit des L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanals, RyR, TnI,

etc.), die an der elektromechanischen Kopplung (EMK) beteiligt sind, phosphoryliert. Phospholamban (PLB) ist ein regulatorisches Protein der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Zytoplasma in das SR transportiert. Im nicht-phosphorylierten Zustand hemmt PLB die SERCA-Aktivität. Durch Phosphorylierung verliert PLB seinen hemmenden Einfluss auf die SERCA. Als Folge transportiert SERCA vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR, so dass sich die Relaxation beschleunigt (positiv lusitroper Effekt). Die PKA phosphoryliert außerdem Troponin-I. Das phosphorylierte TnI inhibiert das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Troponin und verringert dadurch die Affinität von TnC für  $\text{Ca}^{2+}$ , was für eine beschleunigte Dissoziation von  $\text{Ca}^{2+}$  vom TnC und dadurch für eine verbesserte Relaxation verantwortlich gemacht wird (Solaro, 1996).

Die Phosphorylierung der  $\beta 2$ -Untereinheiten des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals und des Ryanodinrezeptors steigert die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle und es kann mehr  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle einströmen und aus dem SR freigesetzt werden. Dies führt zu einer Steigerung der Kontraktionskraft und Kontraktionsgeschwindigkeit (positiv-inotroper Effekt), (Abb. 1.5), (Bers, 2002).

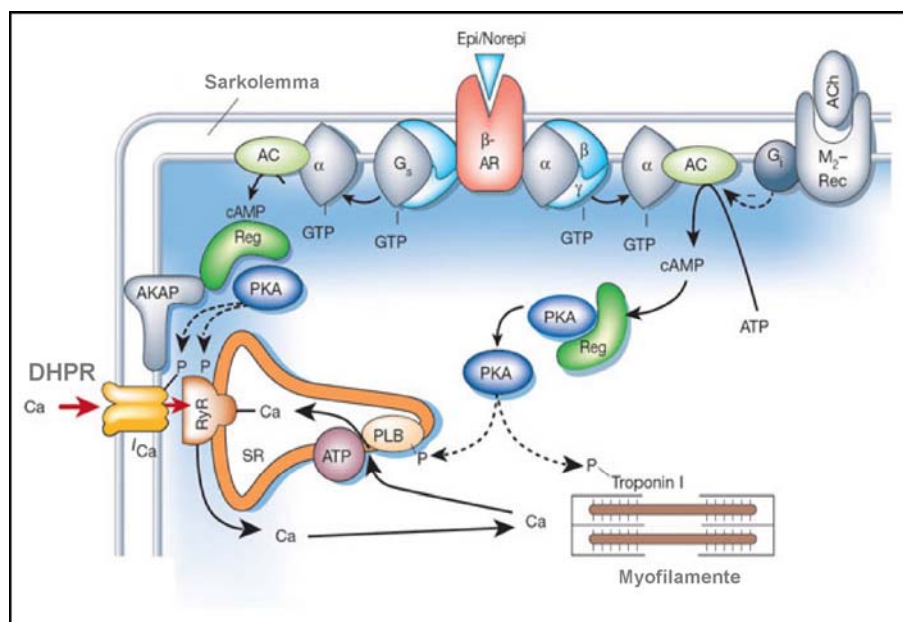


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der  $\beta$ -adrenergen Stimulierung. AC, Adenylatzyklase; ACh, Acetylcholin;  $\beta$ -AR,  $\beta$ -adrenerger Rezeptor; PLB, Phospholamban; PKA, Proteinkinase-A; Reg, PKA-regulatorische

Untereinheit; SR, sarkoplasmisches Retikulum; AKAP, Ankerprotein der Kinase-A;  $G_i$ , inhibierendes GTP-bindendes Protein;  $G_s$ , stimulierendes GTP-bindendes Protein;  $M_2$ -Rec, muskarinerge Rezeptor; Epi, Epinephrin; Norepi, Norepinephrin; P, Phosphat; RyR, Ryanodinrezeptor; DHPR, Dihydropyridinrezeptor; ATP, Adenosin-5'-triphosphat; Ca,  $Ca^{2+}$ -Ionen (Bers, 2002).

Eine Aktivierung der muskarinergen Rezeptoren durch Acetylcholin, den Neurotransmitter des Parasympathikus, führt zu einer Reduktion der  $\beta$ -adrenergen Stimulierung in Herzmuskelzellen. Die Aktivität der Adenylatzyklase wird durch ein inhibierendes GTP-bindendes Protein ( $G_i$ ) gehemmt und dadurch die Bildung von zyklischem Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP) aus Adenosin-5'-triphosphat (ATP) verringert, (Abb. 1.5).

### 1.3 Der kardiale L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal

Spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle sind integrale multimere Membran-Proteinkomplexe und bestehen aus maximal vier Untereinheiten ( $\alpha_{1C}$ -,  $\beta$ -,  $\alpha_2\delta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit), die den Eintritt von  $Ca^{2+}$ -Ionen durch die Zellmembran in die Zelle ermöglichen (Catterall, 2000). Basierend auf den unterschiedlichen biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften des Kanals erfolgte eine Einteilung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle in 3 verschiedene Familien. Die ersten beiden Familien werden bei hohem Membranpotential (-40 mV) aktiviert. L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle (L, Long-Lasting) kommen hauptsächlich in elektrisch erregbaren Zellen, in Muskelzellen (Herz-, Skelett- und glatter Muskulatur) und in neuronalen Zellen vor. Aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften zählen sie zu den Dihydropyridin-sensitiven High-Voltage-Activated (HVA)-Kanälen (Striessnig, 1999). Die zweite Familie (P/Q-, N-, R-Typ) ist überwiegend in Nervenzellen zu finden. Die dritte Familie (T-Typ) wird im Gegensatz dazu schon bei schwacher Depolarisation (-70 mV) aktiviert und befindet sich in

einer Vielzahl von Zellen (Neuronen, Herzzellen), wo sie an der Kontrolle des Aktionspotentials und des Reizleitungssystems (repetitive Antwortgebung, Feuerung) beteiligt sind. Innerhalb einer Familie ist die Aminosäuresequenz über 70 % identisch, zwischen den Familien weniger als 40 % (Ertel, 2000).

Der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal zeigt in seinem kinetischen Verhalten ein schnelles (im Millisekundenbereich) und ein langsames (im Sekundenbereich) Schaltverhalten. Es konnten drei Öffnungszustände für den Einzelkanal beobachtet werden. Im sogenannten Mode 0 öffnet sich der Kanal während der Depolarisation kaum oder gar nicht (inaktiv). Im Mode 1 (Short-Opening-Mode) ist die Aktivität und Öffnungszeit kurz (ca. 1 ms). Dies entspricht dem normalen Öffnungszustand. Mode 2 (Long-Opening-Mode) ist durch lange Öffnungszeiten (5-20 ms) gekennzeichnet (Hess, 1984). Mode 2 wird bei  $\beta$ -adrenerger Stimulierung und starker Depolarisation favorisiert (Yue, 1990).

Kommt es zu einer Anhäufung von freiem, intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  wird der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal inaktiviert (negative Rückkopplung). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -konzentrationsabhängige Inaktivierung verläuft schneller als die spannungsabhängige, bei der sich der Kanal mit der Zeit (Repolarisation) schließt.

### 1.3.1 Struktur des kardialen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals

Der kardiale L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal besteht aus mindestens drei Untereinheiten: der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit, der regulatorischen  $\beta_2$ -Untereinheit und der glykosylierten  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit (Hosey, 1996).

Die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit bildet die ionenleitende Pore des Kanals. Sie besteht aus vier homologen Domänen (I, II, III, IV). Jede der Domänen I-IV enthält

sechs membranumspannende Segmente (S1-S6) (Keef, 2001). Das S4-Segment jeder homologen Domäne dient als Spannungssensor. Bei einer Änderung des Membranpotentials dringt das S4-Segment tiefer in die Membran ein. Dies führt zu einer Konformationsänderung und die Kanalpore wird geöffnet (Catterall, 2000). Die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit besitzt Bindungsstellen für die therapeutisch wichtigen Substanzklassen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Blocker.  $\text{Ca}^{2+}$ -Blocker vom Dihydropyridintyp (DHP) befinden sich in Domäne III, im Bereich S5, während die Bindungsstellen für  $\text{Ca}^{2+}$ -Blocker vom Typ Phenylalkylamin (PAA) in unmittelbarem Anschluss an S6 der Domäne IV lokalisiert werden (Hofmann, 1999).

Die  $\alpha_2$ -Untereinheit ist extrazellulär lokalisiert und über eine Disulfidbrücke mit der  $\delta$ -Untereinheit verbunden. Die  $\alpha_2$ -Untereinheit und die  $\delta$ -Untereinheit sind stark glykosyliert. Die  $\delta$ -Untereinheit ist ein integrales Membranprotein und verankert die  $\alpha_2$ -Untereinheit in der Zellmembran. Funktionell üben diese Untereinheiten moderate modulatorische Effekte aus. Das  $\delta$ -Protein stabilisiert das Schaltverhalten der Kanäle, während das  $\alpha_2$ -Protein unterstützend auf die DHP-Bindung zur  $\alpha_1$ -Untereinheit wirkt (Striessnig, 1999). Es wurden drei Isoformen der  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheiten beschrieben. Die Isoformen 1 und 2 (50 % identisch in der AS-Sequenz) sind im Herzen exprimiert (Klugbauer, 1999).

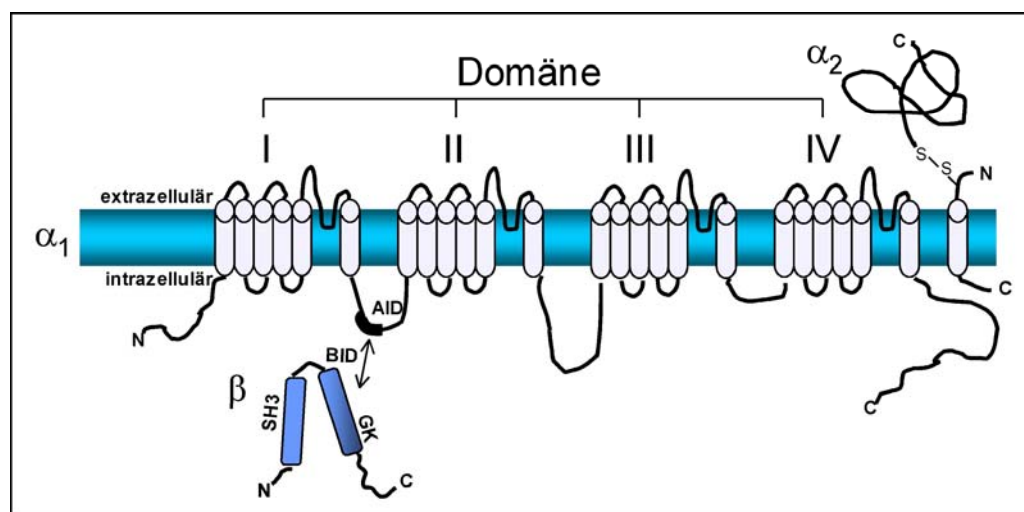


Abb. 1.6: Molekulare Struktur des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. Dargestellt ist der Aufbau der ionenleitenden  $\alpha_1$ -Untereinheit und ihre assoziierten Proteine, der  $\beta_2$ - und der  $\alpha_2/\delta$ -Untereinheit.  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -Protein interagieren über

konservierte Bindungsdomänen (AID und BID) miteinander. Die AID ( $\alpha_1$ -Interaktionsdomäne) ist in der 1. zytoplasmatischen Schleife zwischen Domäne I und II der  $\alpha_1$ -Untereinheit lokalisiert. Sie bindet an die BID ( $\beta$ -Interaktionsdomäne), die sich in der 2. konservierten Domänen aller  $\beta$ -Untereinheiten befindet. In der 1. konservierten Domäne der  $\beta$ -Untereinheiten ist eine SH3-Domäne lokalisiert (Keef, 2001; McGee, 2004).

### 1.3.2 Die $\beta 2$ -Untereinheit reguliert den kardialen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal

Die Kopplung der  $\beta 2$ -Untereinheit an die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit führt zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude und zu einer Veränderung der Aktivations- und Inaktivationskinetik (De Waard, 1996).

Bisher wurden vier Gene, die für  $\beta 2$ -Untereinheiten ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ) kodieren, identifiziert und im Herzen exprimiert (Foell, 2004). Theoretisch können alle  $\beta$ -Isoformen mit der hochkonservierten  $\alpha$ -Interaktionsdomäne (AID) der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit, die sich in der 1. zytoplasmatischen Schleife zwischen der Domäne I und II befindet, interagieren (Pragnell, 1994). Auch wenn die Zusammensetzung der Untereinheiten nicht vollständig geklärt ist, wird angenommen, dass die  $\beta 2$ -Untereinheit die intrazelluläre, akzessorische Untereinheit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in adulten Säugetierherzen ist (Haase, 2000; Dolphin, 2003).

Alle  $\beta$ -Isoformen und Spleißvarianten besitzen zwei zentrale konservierte Domänen, die von variablen N- und C-terminalen Regionen flankiert werden. In der 1. konservierten Domäne der  $\beta 2$ -Untereinheit konnte eine Src-Homologie-Typ-3-Domäne (SH3-Domäne) lokalisiert werden, die erstmals bei der Trysin-Kinase Src aus dem Rous-Sarcom-Virus identifiziert wurde. Mutationen in der SH3-Domäne stören die Interaktion der  $\alpha_1$ - und  $\beta 2$ -Untereinheit und das Membran-Targeting des Kanalkomplexes wird unterbrochen (Chien, 1998; Gao, 1999). SH3-Domänen umfassen ca. 60 Aminosäuren und vermitteln eine Protein-

Protein-Interaktion durch Bindung an ein prolinreiches Motiv (PxxP) (Zarrinpar, 2003). Dies veranlasste zu der Spekulation, dass auch die  $\beta$ -SH3-Domäne Proteininteraktionen moduliert, da die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit in den zytoplasmatischen Domänen mehrere PxxP-Motive besitzt (Chen, 2004).

In der 2. konservierten Domäne der  $\beta$ 2-Untereinheit konnte eine Guanylatkinase-Domäne (GK-Domäne) gezeigt werden (Hanlon, 1999). SH3- und GK-Domänen sind charakteristisch für eine große membranassoziierte Guanylatkinase-Familie (MAGUK's). Ein weiteres Charakteristikum dieser Familie ist, Interaktionen mit anderen Proteinen einzugehen. Parallel dazu konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ 2-Untereinheit mit dem Riesenprotein Ahnak interagiert (Haase, 1999). Experimentell eingefügte Mutationen in der SH3- und GK-Domäne äußern sich durch falsche Platzierung der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit in die Membran und beeinflussen dadurch die „Second-Messenger“-Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Hoskins, 1996).

Die SH3-GK-Domäne bildet eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aus und kann inter- und intramolekular wirken (McGee, 2004). Die AID der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit bindet zu einer hydrophoben Einkerbung der GK-Domäne. Diese hydrophobe Interaktion zwischen der  $\alpha_{1C}$ - und der  $\beta$ 2-Untereinheit ist konserviert (Chen, 2004).

Die  $\beta$ -Interaktionsdomäne (BID), die bei allen  $\beta$ -Untereinheiten in der zweiten konservierten Domäne lokalisiert ist, ist für die Interaktion mit der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit verantwortlich. Die BID wird zwar nicht direkt gebunden, hat aber eine strukturgebende Rolle. Sie ist essentiell für die richtige Faltung der SH3- und GK-Domäne. Punktmutationen in der BID hatten nicht nur den Verlust der Bindung zur AID zur Folge (De Waard, 1994), sondern veränderten auch das Faltverhalten und die Struktur der SH3-GK-Domäne (Chen, 2004).

Die  $\beta$ 2-Untereinheit besitzt nicht nur eine regulatorische Funktion, sondern



fördert auch den Transport der  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit an die Plasmamembran und erhöht den Einbau in die Plasmamembran (Dolphin, 2003). Auch wenn die genaue Funktionsweise, wie die  $\beta 2$ -Untereinheit die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit in der Plasmamembran lokalisiert, noch nicht geklärt ist, wird die  $\beta 2$ -Untereinheit für die genaue Translokation benötigt (Gerster, 1999; Dolphin, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass der Einbau der  $\alpha_1$ -Untereinheit in die Plasmamembran wesentlich effizienter war, wenn die  $\beta 2$ -Untereinheit koexpressiert wurde (Gao, 1999). Ohne Koexpression der  $\beta 2$ -Untereinheit bleibt die  $\alpha_1$ -Untereinheit überwiegend im endoplasmatischen Retikulum. Demgegenüber ist die  $\beta 2$ -Untereinheit ohne Koexpression der  $\alpha_1$ -Untereinheit überwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Gerster, 1999).

### **1.4 Ahnak erhält die Zellstruktur und reguliert den L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal**

Im Rind wurde 1989 ein 680 kDa großes Protein in isolierten Desmosomen entdeckt und es wurde Desmoyokin genannt (Hieda, 1989). In einer späteren Studie konnte Desmoyokin auch als plasmamembran-assoziiertes Protein in Maus-Keratinocyten nachgewiesen werden (Hashimoto, 1993; Masunaga, 1995). Ahnak (hebräisch: Riese), ein ubiquitäres Phosphoprotein mit etwa 700 kDa, wurde als nukleäres Protein in menschlichen Neuroblastomen und kleinen Lungenkarzinomen identifiziert (Shtivelman, 1992). Für beide Proteine, Ahnak (human) und Desmoyokin (Mus musculus), konnte eine Homologie von 80-84% bestimmt werden (Hashimoto, 1993; Masunaga, 1995). Das Ahnak/Desmoyokin-Gen wurde im menschlichem Genom auf dem Chromosom 11q12-q13 (Kudoh, 1995) und im Mausgenom auf dem Chromosom 19 lokalisiert.

Ahnak/Desmoyokin lässt sich in drei Hauptdomänen unterteilen: ein relativ kurzer N-Terminus von 251 AS und ein 1002 AS-großer Carboxylterminus

flankieren eine mittlere, hochkonservierte Domäne (Abb. 1.7). Dieser, ca. 4300 AS-große, zentrale Teil setzt sich wiederum aus 38 (Kingsley, 2001) repetitiven Sequenzen zusammen. Die Anordnung erfolgt nach einem bestimmten Schema ( $\varphi \pm \varphi P \pm \varphi \pm$ ), wobei hydrophobe ( $\varphi$ ) und hydrophile ( $\pm$ ) Aminosäuren alternieren und in jeder 7. Position ein Prolinrest (P) angeordnet ist. Daraus ergibt sich eine  $\beta$ -Sheet-Sekundärstruktur mit einer Periode von 2,33 (Shtivelman, 1992).

Neuere Untersuchungen ergaben, dass es ein ähnliches Ahnak-Protein (Ahnak2) auf Chromosom 14q32 (human) gibt. Es besitzt zwar die gesamte Struktur der repetitiven Einheiten, unterscheidet sich aber im N- und C-terminalen Bereich von Ahnak (Komuro, 2004). Bei der Maus liegt Ahnak2 auf Chromosom 12.

Ahnak2 enthält in seinen Repeats mehrere PxxP-Motive, Ahnak besitzt dagegen zwei PxxP-Motive in seinem C-Terminus. Der N-Terminus von Ahnak2 enthält ein 90 AS-großes Segment, das vermutlich die Funktion einer PDZ-Domäne erfüllt. Diese Domäne ist charakteristisch für Proteine, die mit dem C-Terminus von Kanalproteinen interagieren und damit auch am  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport beteiligt sind (Komuro, 2004). Bei der Maus konnte in den repetitiven Sequenzen der zweiten Isoform von Ahnak, neben einigen PxxP-Motiven, an AS-Position 45-70 (Accessionnummer: XP\_989248) ein zusätzlicher Leuzin-Zipper identifiziert werden, der sich bei Ahnak im C-Terminus befindet.

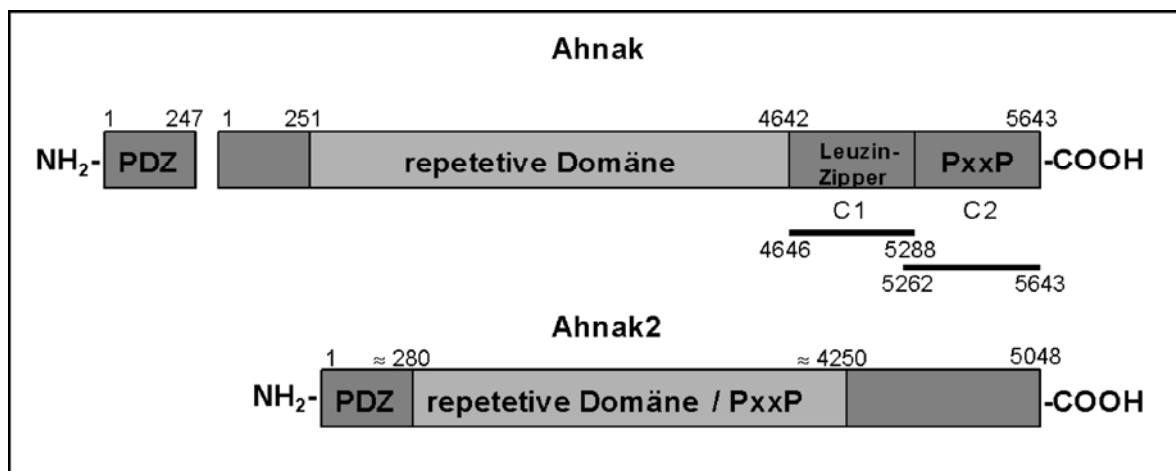


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Isoformen 1 und 2 von Ahnak. Gezeigt sind die drei strukturellen Hauptdomänen der Riesenproteine. Eine große mittlere Domäne mit repetitiven, konservierten Sequenzen wird von einer N- und C-terminalen Region flankiert. Die 247 AS-große, abgesetzte, N-terminale Domäne von Ahnak1 ist erst seit Oktober 2006 in der Datenbank verfügbar. In der C-terminalen Region von Ahnak befinden sich die Interaktionsstellen (C1 und C2) für die  $\beta$ 2-Untereinheit, wobei C2 besser bindet als C1 (Hohaus, 2002). Das PxxP-Motiv, die potenzielle Bindungsstelle für die SH3-Domäne der  $\beta$ 2-Untereinheit, befindet sich bei Ahnak im C-Terminus und bei Ahnak2 in den repetitiven Sequenzen. Beide Proteine besitzen N-Terminal eine PDZ-Domäne.

Strukturuntersuchungen lassen vermuten, dass die repetitiven Sequenzen beider Ahnak-Proteine eine antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur, ähnlich wie bei  $\beta$ -Propeller-Proteinen, besitzen (Abb. 1.8). Sie erscheinen in der Nähe der Z-Scheibe von Kardiomyozyten oder in Verbindung mit dem L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal und können beide durch die Proteinkinase-A phosphoryliert werden. Ihre Lokalisation lässt vermuten, dass sie an der elektromechanischen Kopplung in Kardiomyozyten beteiligt sind (Komuro, 2004).

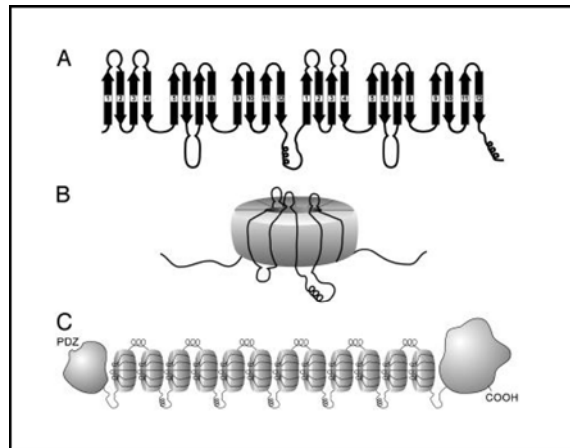


Abb. 1.8: A zeigt die vermutete  $\beta$ -Faltblattstruktur aus jeweils vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die über einen Loop miteinander verbunden sind. In B wird vermutet, dass es sich bei Ahnak um einen siebenblättrigen Propeller handelt, wobei 28 Faltblätter zu einer scheibenförmigen Struktur zusammengefügt sind. Ausgehend von diesen Vermutungen ist das ganze Ahnak-Molekül schematisch in C dargestellt, wobei die strukturell undefinierten N- und C-Termini über die Propeller miteinander verbunden sind (Komuro, 2004).

Ahnak ist im Nukleus von Tumorzellen lokalisiert (Shtivelman, 1993). Im Gegensatz dazu ist Ahnak in Maus-Keratinocyten hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, wenn die Zellen in einem Medium mit geringer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kultiviert werden. Eine Translokation des Proteins zur Plasmamembran nimmt mit der Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu (Hashimoto, 1995). Die Lokalisation entlang der Zellmembran lässt eine funktionelle Rolle bei der Zelladhäsion vermuten. Protein-Expressionsanalysen bei adultem Mausgewebe ergaben, dass Ahnak bevorzugt in allen Muskelzellen und auskleidenden Epithelzellen exprimiert wird, wogegen es in Geweben mit sekretorischer und absorbierender Funktion fehlt (Gentil, 2003).

Die C-terminale Ahnak-Region besitzt putative regulatorische Elemente: ein Kernexportsignal (Shtivelman, 1993; Sussman, 2001), mehrere Kernlokalisationssequenzen und eine Leuzin-Zipper-Domäne (Kingsley, 2001), ebenso Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase-B und -C (PKB und PKC) (Hashimoto, 1995; Nie, 2000; Sussman, 2001).

Die Expression und Phosphorylierung des Ahnak-Proteins ist abhängig vom Zellzyklus reguliert. Die höchste Expression wurde in ruhenden oder ausdifferenzierten Zellen beobachtet. Die Phosphorylierung ist dagegen in stark proliferierenden Zelllinien erhöht (Shtivelman, 1993). Die Erniedrigung von Ahnak in Neuroblastom-Zellen und kleinen Lungenkarzinomen (Shtivelman, 1993) lassen vermuten, dass Ahnak an der Tumorbildung beteiligt ist.

Die repetitive Ahnak-Domäne und der C-Terminus interagieren mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Protein S100B. In Anwesenheit hemmt S100B den intrazellularen  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom in Astrocyten. Nach Ischämie konnte eine erhöhte S100B-Proteinexpression in Ratten- und Humanherzen nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass S100B ein Regulatorprotein für Ahnak ist und damit indirekt Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung nimmt (Gentil, 2001).

In Kardiomyozyten assoziiert Ahnak mit der  $\beta 2$ -Untereinheit des kardialen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals an der Plasmamembran und wird nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung durch PKA phosphoryliert (Haase, 1999; Hohaus, 2002). In späteren Studien wurden die Interaktionsstellen der kardialen  $\beta 2$ -Untereinheit mit Ahnak charakterisiert. Ahnak bindet mit hoher Affinität über seinen C-Terminus (AS 5262-5643, Ahnak-C2) an die  $\beta 2$ -Untereinheit. Durch Ultrazentrifugation wurden zwei Bindungsstellen der  $\beta 2$ -Untereinheit, mit unterschiedlichen Affinitäten, nachgewiesen. Der C-Terminus der  $\beta 2$ -Untereinheit (AS 195-606) bindet mit einer höheren Affinität als der N-Terminus (AS 1-200), (Hohaus, 2002).

Neben dem „Full-length“-Ahnak konnte noch ein C-terminales Ahnak-Fragment in Kardiomyozyten identifiziert werden. Diese Ahnak-Isoform ist am Z-Streifen des kontraktiles Apparates lokalisiert und scheint einen stabilisierenden Effekt auf die Muskelkontraktion, durch seine Interaktion mit dem Aktin, zu haben (Haase, 2004).

In *vitro* bindet die C-terminale Ahnak-Region (AS 5262-5643) an G-Aktin (globuläres Aktin) und cosedimentiert mit F-Aktin (fibrilläres Aktin). Ahnak könnte somit eine funktionelle und strukturgebende Rolle bei der subsarkolemmalen Zytoarchitektur spielen (Hohaus, 2002). Ahnak bindet an der Plasmamembran nicht nur an Aktin, sondern auch an Annexin2/S100A10. Die Interaktion von Annexin2 zum C-Terminus von Ahnak wird dabei über S100A10 vermittelt. Eine Erniedrigung der Expression von Annexin2 und S100A10 hemmt die Assoziation zwischen Ahnak und der Plasmamembran, wobei eine Erniedrigung der Expression von Ahnak mit Hilfe der small interfering RNA (siRNA) eine Verminderung der Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes zur Folge hat. Dies lässt vermuten, dass die Interaktion zwischen Ahnak und Annexin2/S100A10 die Organisation des Aktin-Zytoskelettes und die Zytoarchitektur der Zellmembran reguliert (Benaud, 2004). Es konnten 2 Bindungsmotive des Annexin2-Tetramer (A2t) in Ahnak nachgewiesen werden. Das erste Motiv (A2tBP1) befindet sich im C-Terminus, das zweite Motiv (A2tBP2) im N-Terminus von Ahnak, wobei A2tBP2 eine geringere Affinität zu Ahnak besitzt als A2tBP1. Bei Überexpression der Bindungsmotive in lebenden Zellen konnten diese im Zytosol nachgewiesen werden. Nach Stresseinwirkung (Sauerstoffmangel bzw. mechanischer Stress) findet eine Relokalisation zur Plasmamembran statt. Dies lässt vermuten, dass der A2t-Komplex in lebenden, ruhenden Zellen im Zytoplasma lokalisiert wird und seine Translokation zur Plasmamembran von der Zell-Signaltransduktion abhängt (De Seranno, 2006).

Ahnak interagiert auch mit Dysferlin und wird dadurch in der Plasmamembran verankert. Dysferlin ist ein 230 kDa-großes, sarkolemmales Transmembranprotein, das vermutlich bei der Reparatur von Membranen der Muskelzellen eine Rolle spielt. Mutationen im Dysferlin-Gen, die die Proteinexpression von Dysferlin im Skelettmuskel reduzieren, verursachen Dysferlinopathien (Gliedergürtel-Muskeldystrophie/2B (LGMD2B)). Im gesunden Skelettmuskel sind Ahnak und Dysferlin an der Zellmembran lokalisiert. Bei Dysferlinopathien

korreliert eine Reduktion oder der Verlust von Dysferlin mit dem Verlust von Ahnak. Dysferlin wird anscheinend durch Ahnak mit dem Aktin des Zytoskeletts verbunden und stabilisiert so das Sarkolemma (Huang, 2006). Ahnak wurde auch im Lumen von Enlargeosomen identifiziert. Enlargeosomen sind auch an der Membranreparatur beteiligt. Ahnak könnte somit auch eine Rolle bei der Erhaltung der Membranreparatur spielen. In ruhenden Zellen befindet sich Ahnak im Lumen der Vesikel, nach Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erschien es an der Zelloberfläche ( $\text{Ca}^{2+}$ -induzierter Exozytoseprozess) (Borgonovo, 2002).

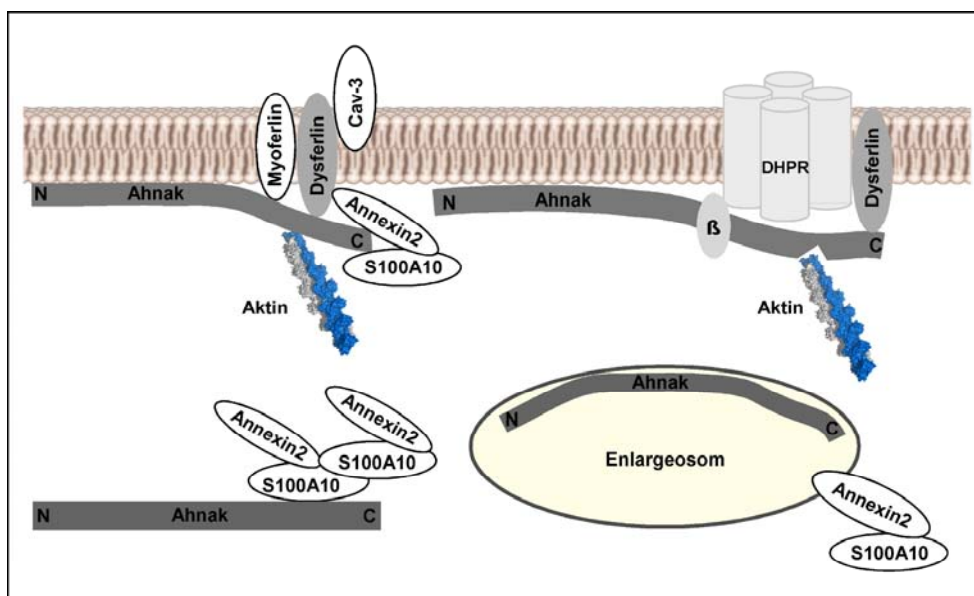


Abb. 1.9: Schematische Darstellung von Ahnak-Komplexen im Muskel. Ahnak wird über das Transmembranprotein Dysferlin (links) oder über die  $\beta$ 2-Untereinheit des kardialen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals (rechts) mit dem Sarkolemma verankert, was wiederum das Aktin-Zytoskelett mit der Plasmamembran verbindet. Ahnak ist auch an  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Exozytoseprozessen von Enlargeosomen beteiligt. Ebenso interagiert Ahnak mit Annexin2/S100A10 und ist an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und der Regulation der Zytoarchitektur der Zellmembran beteiligt. Cav-3 steht für T-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal.

### 1.5 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Ahnak in verschiedenen Zelltypen und im Herzen zu charakterisieren. Es wurden Modelle, bei denen die

Ahnak-Expression experimentell ausgeschaltet wurde, auf funktionelle Ausfälle hin untersucht, sowie Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Hilfe von Fusionsproteinen analysiert.

1. Es wird vermutet, dass Ahnak eine Rolle bei der Zelldifferenzierung und Tumorbildung spielt, da Ahnak in proliferierenden Zellen reprimiert ist. Daher wurden ahnakdefiziente, embryonale Stammzellen (ES) entwickelt, an denen Proliferationstests durchgeführt wurden, um zu untersuchen, ob ein Ausfall von Ahnak in ES-Zellen eine Erhöhung der Proliferation zur Folge hat.
2. Die Interaktion von Ahnak mit der  $\beta 2$ -Untereinheit hemmt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit des kardialen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. In dieser Arbeit sollte daher die Voraussage getestet werden, ob ein Ausschalten von Ahnak in Kardiomyozyten, bzw. im ganzen Herzen, die intrinsischen, kontraktile Parameter der Zellen, bzw. des ganzen Herzens, erhöht. Daher wurde
  - a. die elektromechanische Kopplung (simultane Messungen von Kontraktionsamplitude und intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal) einzelner Kardiomyozyten und
  - b. die aktiven und passiven Eigenschaften (Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, systolisch linksventrikulärer Druck und diastolische Druck-Volumen-Beziehung) im isoliert perfundierten Mäuseherzen („Working-Heart“) analysiert.
3. Da Ahnak wichtige Funktionen in der Zelle besitzt, könnte Ahnak ein krankheitsrelevantes Gen darstellen. In Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Vera Regitz-Zagrosek vom Deutschen Herzzentrum Berlin/Universitätsmedizin Charité Berlin, wurde das Ahnak-Gen mittels Single-Strand Conformational Polymorphism Analyse (SSCP) auf Missense-Mutationen hin analysiert. Es sollte untersucht werden ob



Mutationen im C-Terminus des Ahnak-Gens in Patienten mit Kardiomyopathien vorkommen.

4. Weiter wurde untersucht, ob natürliche Missense-Mutationen und experimentelle Mutationen von Ahnak die Interaktion zur  $\beta 2$ -Untereinheit beeinflussen. Diese Untersuchungen wurden mit Konstrukten des C-Terminus von Ahnak durchgeführt, in denen verschiedene Mutationen eingeführt wurden (I5236T, T5549M, und Ala-Scan eines PxxP-Motives an Position 5544/5547). Mit diesen Konstrukten wurden dann rekombinante Fusionsproteine produziert um Bindungsstudien mit Hilfe der Oberflächen Plasmon Resonanz und der Sedimentations-Ultrazentrifugation durchzuführen.
5. Nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation kommt es zu einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. Ich habe in dieser Arbeit versucht zu zeigen, dass PKA-abhängige Phosphorylierung von Ahnak das Bindungsverhalten zur  $\beta 2$ -Untereinheit beeinflussen kann und Ahnak damit eine regulatorische Rolle bei der EMK spielt. Außerdem wurde vermutet, dass Ahnak-Defizienz den Effekt der  $\beta$ -adrenergen Stimulation aufhebt bzw. erniedrigt.

Um diese Vermutungen zu bestätigen, sollten:

- a. Ahnak-Fusionsproteine und die  $\beta 2$ -Untereinheit durch die katalytische Untereinheit der PKA phosphoryliert und die funktionellen Konsequenzen der Ahnak- bzw.  $\beta 2$ -Phosphorylierung in Bindungsstudien analysiert werden.
- b. adulte Kardiomyozyten und das isoliert perfundierte Herz im „Working-Heart-Modus“ homozygoter Ahnak-Knock-Out-Mäuse durch Zugabe von Isoprenalin stimuliert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen: Biozym (Oldendorf, Deutschland), Difco (Detroit, Michigan, USA), Gibco/BRL (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva Feinbiochemika (Heidelberg, Deutschland) und Sigma Chemie (Deisenhofen, Deutschland), bezogen.

#### 2.1.2 Oligonukleotide

Tabelle 2.1 zeigt die Sequenz der Oligonukleotide, die in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt wurden. Die jeweiligen Vorwärtsprimer sind mit fw und die Rückwärtsprimer mit rev gekennzeichnet.

Bezeichnung	Primersequenz
A fw	5'- ATCCGAGTTCCAGGAGTAG -3'
A <sub>1</sub> fw	5'- <i>tctctaga</i> GGTACAGGCCCCATCCCTCC -3'
ahnak-C1 I5236T fw	5'- GGTCTTCCAGGCACTGGTGTTC AAGGCC -3'
ahnak-C1 I5236T rev	5'- GGCCTTGAACACCAGTGCCTGGAAGACC -3'
ahnak P3-P4 P5544/5547A fw	5'- TTCTCTGGAGCTTCCACCGCGACGGGG -3'
ahnak P3-P4 P5544/5547A rev	5'- CCCCCTCGCGGTGGAAGCTCCAGAGAA -3'
ahnak P3-P4 T5549M fw	5'- CTTCCACCCCGATGGGGACGCTGGA -3'
ahnak P3-P4 T5549M rev	5'- TCCAGCGTCCCCATCGGGGTGGAAG -3'
B <sub>x</sub> rev	5'- TT <i>tctcgag</i> ACATCTGGAGCAC -3'
C1 mut <sub>γ</sub> fw	5'- <i>ttg gatcc</i> AAAGGGAGCCTT-3'

Bezeichnung	Primersequenz
C1 mut $\delta$ rev	5' - <i>ccaagctt</i> GACATGGAAACC-3'
EST 1 fw	5'- AGGCTTGGACTTGGGTGGCA -3'
Neo 1L	5' -GTTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCC-3'
opt1 fw	5'- CTCCAGAGTGGACATAGAGAC -3'
opt2 rev	5'- TGCTTTGAACCCTGGCACA -3'
3' pGEX Sequencing Primer	3' -CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-5'
5' pGEX Sequencing Primer	5' -GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'
P7 opt fw	5'- CCAGAATGGAATTTGAAGATGC -3'
P21 rev	5' -TTTTAGCTTCAGGGCCTTCG -3'
T0 fw	5'-CTCGGATTTACAGACCGAATG -3'
T0 rev	5'-GCTGCTCCTGATATCAGTG -3'
T1 fw	5'-GGCAGATTTCTGGGCCTGA -3'
T1 rev	5'-CCTCTGCTCTCAACTTGGAC -3'
T2 fw	5'-CTTGGTGAAGGGCATTGAG -3'
T2 rev	5'-TACCTTCTCTGGCCGTGAG -3'
T3 fw	5'-GGTCACTTGGAAAGTGGATC -3'
T3 rev	5'-ACTGGCTCACCAGAAGCATC -3'
T4 fw	5'-CGAGTGGGAAGAGTCTGAAG-3'
T4 rev	5'-GAAAGAGAGTTCTCTGGACC -3'
T5 fw	5'-CACCGAAAGGCAAATTCTCC -3'
T5 rev	5'-AGGCAAGTTACAGGGGAGTG -3'
T6 fw	5'- GGTGGATTGGGGTCAAAGAG -3'
T6 rev	5'- AGCCTTGGGTGGTGTGTTC -3'
T7 Promotor	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'

Tab. 2.1: Die benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez, Biochemisch-Technologisches Zentrum (Berlin-Buch, Deutschland) hergestellt. Die eingefügten Punktmutationen sind fettgedruckt, die Restriktionsschnittstellen klein und kursiv dargestellt.

### 2.1.3 Puffer und Stammlösungen

Alle Lösungen wurden nach standardisierten Protokollen angesetzt (Sambrook, 1989). Die benötigten Chemikalien wurden den Erfordernissen gemäß mit bidestilliertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

LB-Agar	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar, (auf 1 l H <sub>2</sub> O; pH 7,2)
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, (auf 1 l H <sub>2</sub> O; pH 7,2)
SOC-Medium	20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; 10 ml KCL (250 mM); (auf 1 l H <sub>2</sub> O; pH 7,0) nach dem Autoklavieren: 5 ml MgCl <sub>2</sub> (2 M, steril) und 20 ml Glucose (1 M, steril)
50 X TAE	2 M Tris-HCl (pH 8,2), 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA
TE	10 mM Tris-HCl (pH8,0), 1 mM EDTA

### 2.1.4 Bakterienstämme

Zur Transformation von PCR-Fragmenten wurden *E.coli*-Zellen des Stammes: TOP10F' (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), XL1-Blue (StratageneEurope, Amsterdam, Niederlande), sowie für größere Plasmide (<8000bp) XL10-Gold (StratageneEurope), genutzt. BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Zellen (StratageneEurope) wurden für die Expression von Proteinen verwendet. Für das Screening der Genbank RPCI21 Mouse Pac wurden

*E.coli*-Zellen des Stammes DH10B (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin-Charlottenburg, Deutschland) benutzt.

### 2.1.5 Art und Herkunft der kultivierten Zellen

ES-E14TG2a	pluripotente, männliche, embryonale Stammzellen der Maus (Stamm 129sv, Artikelnummer ATCC-Nr. CRL-1821), (Promochem GmbH, Wesel, Deutschland)
Feeder-Zellen	Embryonale Fibroblasten; Primärzelllinie aus pT <sub>ph</sub> -KO, periphere Tryptophanhydroxylase; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Claudia S. Wilhelm (MDC, Berlin-Buch, Deutschland).

### 2.1.6 Klonierungsvektoren

Für Klonierungen von PCR-Fragmenten wurde der pCR 2.1 Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Dieser Vektor eignet sich besonders gut aufgrund seiner schnellen, „one-step“ Strategie, das direkte Einbringen eines PCR-Produktes in den Plasmid-Vektor. Er ist mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* linearisiert und besitzt 3'-Thymidin an beiden Enden. Die 3'-T-Überhänge der Insertionsstelle vermeiden die Religierung des Vektors und sind kompartibel mit PCR-Produkten, deren 5'-A-Überhänge durch die Aktivität der Taq-Polymerase entstanden sind.

Für die Elektroporation der ES-Zellen wurde der pTV0-Vektor (Walther, 1998) verwendet, der freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Bader (MDC, Berlin-Buch, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Die Gen-Sequenz der entsprechenden Proteine wurden in den His-Tag-Expressionsvektor pRSET A (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland), sowie in den

prokaryotischen GST-Expressionsvektor pGEX-4T1 (Amersham, Pharmacia, Deutschland) kloniert (Abb. 7.4 - Abb. 7.6)

## **2.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden**

### **2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis, 1987) ist eine Methode, um spezifische DNA-Fragmente zu amplifizieren, die anschließend für die Klonierung eingesetzt werden. Für die PCR wurden die Geräte Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Norwalk, CT.06859, USA) und Biometra T-Gradient Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) verwendet. Die PCR-Methode besteht aus drei Phasen: 1. Denaturierung, 2. Annealing, 3. Extension. Der Zyklus kann zwischen 25–35mal wiederholt werden. Die Phasen wurden in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produktes und der Spezifität der Oligonukleotid-Primer gewählt. Allgemein gilt, dass die Dauer der Phasen 2 und 3 mit der Regel: 1 min pro 1 kb, berechnet wird. Die Amplifizierung erfolgte jeweils in einem Gesamtvolumen von 50 µl.

### **2.2.2 Aufklärung der Gensequenz durch Gen-Bibliotheken-Screening**

Für die Herstellung des Ahnakdefizienz-Konstruktes musste zunächst die Gensequenz von Ahnak im Mausgenom, für den Stamm 129/Sv, aufklärt werden. Durch die bekannten Primer EST1 und opt1 rev konnte die Lücke zum 5'-Ende gefüllt und die neue Sequenz für die 5'-Homologieregion (kurzer Arm, ca. 1000 bp) genutzt werden. Für die Herstellung der 3'-Homologieregion (langer Arm, ca. 5000 bp) wurde ein Bibliotheken-Screening durchgeführt. Die Gen-Bibliotheken stammen vom RZPD (Library

RPCI21 Mouse Pac, Library No: 711). Durch die Amplifizierung eines kleinen DNA-Fragmentes des Ahnak-Gens mit den Primern opt1 fw und opt2 rev konnten drei positive Klone identifiziert werden. Diese wurden dem Forschungszentrum mitgeteilt und es wurde ein zweiter Gen-Bibliotheken-Pool (RPCIP711PP16, RPCIP711PP24, RPCIP711PP78) für ein weiteres Screening geliefert. Mit der selben PCR, die beim ersten Gen-Bibliotheken-Pool verwendet wurde, konnten erneut 3 positive Signale, pro Platte bestätigt und so die Koordinaten für die x-, y- und z-Ebene der Einzelklone ermittelt werden. Die DNA der Einzelklone (RPCI-21 624A13, RPCI-21 189H13, RPCI-21 127O22) wurde durch Sequenzierungen und PCR's zur Aufklärung der 3'-Ahnak-Sequenz genutzt. Die Konzentrationen der einzelnen PCR-Komponenten waren: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland); 1x PCR-Puffer (Invitrogen); 0,2 mM dNTP-Mix (Invitrogen); 1 ng opt1 fw; 1 ng opt2 rev; 1 µl DNA aus dem Genpool; 0,05 U Taq-Polymerase. Die PCR-Produkte wurden in 30 Zyklen: Denaturierung, 94°C (1 min); Annealing, 64°C (1 min); Extension, 72°C (1 min); amplifiziert. Die PCR mit dem Primer-Paar: EST1 fw und opt1 rev unterschied sich in der Annealing-Temperatur (60°C) und in der Konzentration des DNA-Templates (70 ng genomische DNA, 129sv). So konnte für das Gen-Bibliotheken-Screening eine 678 bp-große Bande, für die Aufklärung des 5'-Endes eine 826 bp-große Bande amplifiziert werden.

### 2.2.3 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte durch die Cycle-Sequenzierung und wurde ausschließlich von der Firma Invitex (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Lab Centraal B.V.Haarlem, Niederlande). Die Analyse der Sequenzierungsprodukte erfolgte auf dem ABI PRISM 377 DNA Sequencing-System. Für die Sequenzierung der Plasmid-DNA bis 8 kb wurden 100 ng/µl, für je 5 µl Reaktionsansatz,

benötigt. Die Sequenzierung der pGEX-4T-1 Vektoren wurden mit den Primern: 5`-pGEX-Sequencing-Primer und 3`-pGEX Sequencing-Primer, die pRSET A Vektoren mit dem Primer: T7-Promotor, durchgeführt.

### 2.2.4 Primer-Design

Beim Designen von Primer-Paaren wurden folgende Grundregeln befolgt: Die Länge eines PCR-Primers lag zwischen 18-30 Basen und besaß einen Anteil von 40 - 60 % Guanin und Cytosin (G + C). Es wurde darauf geachtet, dass nur bis zu vier gleiche Basen (z.B. AAAA) aufeinander folgten, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen (frameshifts) zu vermeiden. Die Schmelztemperatur der Primer eines Primer-Paares waren möglichst gleich und unterschieden sich nicht mehr als um 2°C. Die Kenntnis über die Schmelztemperatur ist grundlegend für die Festlegung der Annealing-Temperatur. Die Annealing-Temperatur ( $T_{an}$ ) sollte 55-80°C betragen und wird nach der folgenden Regel berechnet:

$$T_{an} = 4 * (G + C) + 2 * (A + T) - (0 - 10)$$

Um eine bessere Bindung und Elongation zu erhalten, wurden am 3'-Ende die Basen G oder C ein bis zweimal platziert. Da es sich hierbei um eine kritische Amplifikation handelt, wurden die Primer nach dem Einfügen der Punktmutation über eine HPLC gereinigt, um störende Verunreinigungen zu beseitigen.



### 2.2.5 Herstellung des Target-Konstruktes

Für die Amplifikation des kurzen Genabschnittes (kurzer Arm) wurde die Taq-Polymerase der Firma GiBco/BRL (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Als Template diente die genomische DNA des Mäusestammes 129sv. Bei der Amplifikation des langen Genabschnittes (langer Arm) wurde die Advantage<sup>®</sup> cDNA-Polymerase der Firma Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) genutzt. Diese Polymerase eignet sich besonders für die Amplifikation von langen PCR-Produkten. Zu Beginn der PCR kann es, wegen der anfänglich noch niedrigen Temperatur, zu unerwünschten Effekten, wie Fehlhybridisierungen der Primer oder Primerdimerbildungen kommen, die im weiteren Verlauf zu schlechten Ausbeuten oder unspezifischen Produkten führen. Dem soll beim Hot-Start begegnet werden. Deshalb enthält die Advantage<sup>®</sup> cDNA-Polymerase noch einen TaqStart<sup>™</sup>-Antikörper, um automatisch die Bedingungen für eine Hot-Start-PCR zur Verfügung zu stellen. Dieser spezifische Antikörper denaturiert bei hohen Temperaturen und gibt erst dann die Taq-Polymerase für die PCR frei. Die Konzentrationen der einzelnen PCR-Komponenten sind: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1x PCR-Puffer (Invitrogen); 0,2 mM dNTP-Mix (Invitrogen); 1 ng Primer A<sub>1</sub> fw; 1 ng Primer B<sub>x</sub> rev; 100 ng genomische DNA; 2,5 U Taq-Polymerase, in einem Ansatz von 50 µl. Die PCR-Produkte wurden im Biometra T-Gradient Thermoblock mit 30 Zyklen, bei einer Denaturierung von 94°C (1 min), Annealing bei 56°C (1 min) und Extension bei 72°C (1 min), amplifiziert. Die PCR-Komponenten für die Amplifizierung des langen Genabschnittes unterschieden sich: 50 ng Primer P7 opt fw, 50 ng Primer P21 rev, 138 ng genomische DNA und 5 U Advantage<sup>®</sup> cDNA-Polymerase. Nach dem initialen Denaturierungsschritt von 94°C (1 min) folgten 28 PCR-Zyklen, bestehend aus: Denaturierung, 94°C (1 min); Primerhybridisierung, 62°C (1 min) und Kettenverlängerung, 68°C (5 min).

Für den kurzen Genabschnitt konnte eine Bande von 1005 bp und für den langen Genabschnitt eine Bande von 5228 bp amplifiziert werden. Die

erhaltenen PCR-Fragmente wurden in den PCR 2.1 Vector (Invitrogen) zwischenkloniert und später für die Zusammensetzung des Target-Konstruktes weiter verwendet.

### 2.2.6 Klonierung des Target-Konstruktes

Das Target-Konstrukt wurde so entworfen, dass die gesamte 5'-Region, einschließlich potentieller Translations-Startstellen des Ahnak-Gens, deletiert werden sollten. Außerdem wurde mit der Neomycin-Resistenz-Kassette (neo) ein starkes Transkriptions-Stopp-Signal in das Gen eingeführt. Zusätzlich wurde aus dem Herpes-Virus das Thymidinkinase-Gen (HSV-*tk*) an das Ende des Target-Vektors platziert, so dass es bei einer homologen Rekombination eliminiert wird. Bei einem wahllosen Einbau in das Chromosom sollte es erhalten bleiben. Mit Hilfe der Long-Range-PCR (2.2.5) wurden 1 kb- bzw. 5 kb-lange DNA-Fragmente des Ahnak-Gens amplifiziert, die in den pCR 2.1 Vector (Invitrogen) subkloniert und später in den pTV0-Vektor kloniert wurden, wo sie eine Neomycin-Resistenz-Kassette flankieren. Als Erstes wurde die 5'-Homologieregion (kurzer Arm, 1005 bp), über die Restriktionsschnittstellen *XhaI* und *XhoI*, in den pTV0-Vektor gerichtet eingesetzt. Die 3'-Homologieregion (langer Arm, 5228 bp), im pCR 2.1 Vektor (Invitrogen), wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XhoI* herausgeschnitten. Das Subklonieren in den pTV0-Vektor erfolgte als Erstes über die *NheI*-Schnittstelle, wobei *NheI* kompartibel zu *SpeI* ist. Dann wurde die *XhoI*-Schnittstelle mit dNTP's aufgefüllt um doppelsträngige Ligationsenden (blund end) zu erhalten, die die *HpaI* benötigt, um das Fragment in den Vektor ligieren zu können. Alle Enzyme stammen von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland).

### 2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Volumen von 10 µl. Der Ligationsansatz enthielt, neben den zu ligierenden DNA-Fragmenten, die T4-DNA-Ligase (4 Weiss-U, New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland) und den T4-DNA-Ligasepuffer (New England BioLabs). Die gereinigten PCR- bzw. DNA-Fragmente (2.2.12) wurden dabei im 3-fachen Überschuß zum Plasmid dazugegeben. Die Konzentration der DNA-Fragmente, sowie die Konzentration des Vektors wurde nach folgender Formel berechnet:

$$I = \frac{si * [DNA]}{\frac{sv}{\bar{U}} + si} \qquad V = I - [DNA]$$

$I$  ist die einzusetzende Insertmenge,  $si$  ist die Größe des Inserts,  $sv$  ist die Größe des Vektors,  $\bar{U}$  ist der Faktor, in dem das Insert im Überschuß vorliegt,  $[DNA]$  ist die Gesamtmenge an DNA aus Insert- und Vektor-DNA und  $V$  ist die einzusetzende Vektormenge. Die Ligationsansätze wurden bei 16°C über Nacht inkubiert und anschließend direkt für die Transformation in *E. coli*-Stämme (2.2.8) eingesetzt.

### 2.2.8 Transformation

Es wurden sowohl Ligationsansätze (2.2.7) als auch präparierte Plasmid-DNA in verschiedene *E.coli*-Stämme transformiert. Je Transformationsansatz wurden 50 µl kompetente Zellen (One Shot TOP10, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) auf Eis aufgetaut, mit 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 1-50 ng DNA-Ligationsansatz, PCR-Produkt oder Expressionsplasmid hinzu gegeben und erneut für 30 min, auf Eis,

inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 45 Sekunden einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und sofort für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium (2.1.3) wurden die Zellen für 60 min, bei 37°C, bei 225 rpm geschüttelt. Aliquots dieser Ansätze wurden zur Selektion auf antibiotikumhaltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht, bei 37°C im Brutschrank (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) inkubiert. Beim Hitzeschock variierte die Temperatur und die Zeit, je nach Bakterienstamm.

### **2.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli***

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte je nach Größe des Ansatzes mit Hilfe des QIAprep Spin miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) bzw. dem QIAGEN Plasmid Midi Maxi Kit (QIAGEN), nach Angaben des Herstellers.

### **2.2.10 Restriktionsanalyse**

Für die Restriktionsanalyse wurden 0,5-1 ng DNA mit 1-6 U Restriktionsenzym (New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland) und dem, vom Hersteller beigefügten, 10fach Puffer in einem Volumen von 25 µl aufgespalten. Die Hydrolyse erfolgte für gewöhnlich bei 37 °C für 1 h.

### 2.2.11 Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen 0,8-1,6 %igen Agarosegelen. Dazu wurden 0,4 g bzw. 0,6 g Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) in 50 ml 1 x TAE-Puffer (2.1.3) erhitzt, bis sie sich auflöste. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurden 2,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben und in eine Kammer (Agagel Mini Biometra, Göttingen, Deutschland) gegossen. Es wurden Kämme mit einem Taschenvolumen von 25-50 µl verwendet. Alle DNA-Proben wurden mit dem Auftragepuffer Orange G (2 Teile Glycerol, 1 Teil 1 x TAE, Spatelspitze Orange G) versetzt und aufgetragen. Für den Längenvergleich von nativer, doppelsträngiger DNA diente der Supercoiled DNA Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) als Standard. Die Länge der PCR-Produkte, sowie die der hydrolysierten DNA wurde mit Hilfe der Standards: 1 kb DNA Ladder, 100 kb DNA Ladder (Invitrogen) und DNA Molecular Weight Marker XVII (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), abgeschätzt.

Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei Raumtemperatur und mit einer Power Pack P25 Spannungsquelle, bei konstant 100 V (Biometra). Die DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Schirm (366 nm) sichtbar gemacht, analysiert und isoliert. Die Dokumentation erfolgte durch eine Videoaufnahme, wurde elektronisch gespeichert und konnte über einen Video Copy Processor (Modell: P91W, Mitsubishi, Japan) ausgedruckt werden.

### 2.2.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Gelextraktion wurde zum Trennen von DNA-Banden, nach der Restriktionshydrolyse (2.2.10), sowie zum Aufreinigen von PCR-Produkten verwendet. Die hydrolisierten Plasmide bzw. die PCR-Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Banden, die an einem UV-Schirm sichtbar gemacht wurden, wurden mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick GEL Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), nach Anleitung des Herstellers.

### 2.2.13 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse der DNA

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch, durch Messen der Absorption bei 260 nm, nach der Gleichung:

$$C[\mu\text{g} / \text{ml}] = OD_{260} * V * F$$

bestimmt, wobei  $C$  die Konzentration,  $V$  der Verdünnungsfaktor und  $F$  der Multiplikationsfaktor ist, der für dsDNA 50 beträgt. Darüber hinaus ist der Absorptionskoeffizient 260 nm/280 nm (Verhältnis von Nukleinsäuren zu Proteinen in Lösung) ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren. Dabei ist ein Quotient von 1,8-2,0 optimal. Es wurde dafür das UV-1202-VS Spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) verwendet.

## 2.3 Zellkultur-Methoden

### 2.3.1 Medien für die Kultur von ES-Zellen

#### 500 ml ES-Zellmedium:

425 ml DMEM (GiBco/BRL, Karlsruhe, Deutschland), 75 ml fetales Kälberserum, (FKS, Hitze-inaktiviert bei 55°C für 30 min, Gibco), 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100 x Stock, Gibco), 5 ml Antibiotika (100 x Stock; Penicillin/Streptomycin; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 5 ml Nucleoside ((100 x Stock, Nukleosid, (2,99 mM Adenosin, 3 mM Guanosin, 3 mM Cytosin, 2,99 mM Uridin, 0,99 Thymidin), Invitrogen)), 4,2 µl β-Mercaptoethanol, 50 µl LIF (Leukozyten induzierender Faktor, Endkonzentration: 1000 U/ml; Chemicom, Rotterdam, Niederlande).

#### Fibroblasten-Medium:

500 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media), 50 ml fetales Kälberserum, 5 ml Antibiotika (100 x Stock, Penicillin/Streptomycin)

#### Einfriermedium:

92 % fetales Kälberserum, 8 % DMSO (Dimethylsulfoxid, filtriert)

#### Elektroporationspuffer:

20 mM Hepes (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland); 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6 mM Glucose; 0,1 mM β-Mercaptoethanol

**Gancyclovier-Stammlösung:** 200 mM (Sigma Aldrich)

**Geneticin G418:** 100 mg/ml (Invitrogen)

**MitomycinC:** 1 mg MitomycinC (Sigma Aldrich, in 100 ml ES-Zellmedium

### 2.3.2 Kultivierung von ES-Zellen

Männliche ES-Zellen vom Mäusestamm 129sv, der Linie E14TG2a, wurden zusammen mit MitomycinC-behandelten, embryonalen Feederzellen in Kulturschalen ( $\varnothing$  10 cm) kultiviert. Das Kulturmedium (2.3.1) wurde aufgrund der starken Ansäuerung, durch den hohen Stoffwechselumsatz der ES-Zellen, täglich gewechselt. Eine Passagierung wurde, in Abhängigkeit der Zelldichte ( $2,5 \times 10^8$ ), alle 2 - 3 Tage durchgeführt. Bei regulären Passagen wurden die, an den Feederzellen anhaftenden, ES-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA trypsinisiert, von der Oberfläche abgelöst und 1:3 bis 1:8 geteilt. Vor der erneuten Einsaat, in eine Kulturschale mit Feederzell-Monolayer, wurde die Trypsinlösung durch Zentrifugation der Zellen (800 rpm für 3 min) abgetrennt. Bei jeder Passage wurden Stocks der ES-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) angelegt und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

### 2.3.3 Präparation embryonaler Fibroblasten

Um embryonale Fibroblasten für die Kultivierung von ES-Zellen gewinnen zu können, wurden trächtige, neomycinresistente Knock-Out-Mäuse getötet und die Embryonen (13-14 Tage alt) entnommen. Alle folgenden Schritte wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Das Gewebe wurde mit dem Skalpell mechanisch zerkleinert und 30 min bei 37°C, zur Dissoziation der Zellen, mit Trypsin/EDTA (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 10 % FKS/DMEM inaktiviert. Die Zellsuspension wurde erneut mechanisch zerkleinert, von großen Bestandteilen getrennt und nach kurzer Zentrifugation in Kulturschalen (eine pro Embryo), mit Fibroblasten-Medium, kultiviert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und daraufhin 1:3 bis 1:6 geteilt. Die neue Passage wurde in Kulturschalen



eingesät und bei Erreichen der Konfluenz in Stickstoff kryokonserviert ( $1 \times 10^5$  Zellen pro Stock).

### 2.3.4 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Für die Elektroporation wurden  $8 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  männliche ES-Zellen, die sich im exponentiellen Wachstum befinden, in einem Gesamtvolumen von 400  $\mu\text{l}$  Elektroporationspuffer (2.3.1), eingesetzt (Thomas, 1987). Das Targetkonstrukt lag für die Elektroporation in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g}$ , linear und in reiner Form vor. Für die Linearisierung wurde die präparierte DNA portioniert und mit dem Restriktionsenzym *NotI* hydrolysiert. Dann wurde die DNA mit 100% Ethanol und 3M Na-Acetat, über Nacht, ausgefällt. Für die Elektroporation wurden 20  $\mu\text{g}$  DNA in 40  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  benötigt. Die Zellsuspension und die linearisierte DNA wurden in einer Küvette (Gene Pulser Cuvette, 2 mm, Bio Rad, Kalifornien, USA) vereinigt. Bei 500  $\mu\text{F}$ ; 0,24 V und Raumtemperatur wurden die Zellen elektroporiert (MicroPulser, Bio Rad). Nach 10 Minuten wurden die Zellen in Kulturschalen mit Feederzell-Monolayer und frischem ES-Zellmedium eingesät. Der Zusatz von G418 ins Medium (Tag 3, Endkonzentration: 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 1 x PBS) selektiert die erfolgreich transfizierten ES-Zellen mit neo-Resistenz von untransfizierten Zellen. Die zusätzliche Selektion mit Gancyclovir (ab Tag 4, Endkonzentration: 2  $\mu\text{M}$ ) tötet alle Zellen ab, die das Thymidinkinase-Gen (*tk*) zufällig integriert haben. Die Selektion wurde bis zur Isolierung der resistenten ES-Zellen (10-12 Tage) aufrecht erhalten.

### 2.3.5 Isolierung der ES-Zellen

Die Kulturen wurden einmal mit 1x PBS gespült und mit 10 ml 1x PBS überschichtet. Die ES-Zellen wurden mechanisch von der umgebenen Feederzell-Unterlage getrennt und bei 37°C mit 25 µl Trypsin/EDTA vereinzelt. Die Trypsinierung wurde nach 5 min durch Zugabe von 50 µl ES-Zellmedium beendet. Die eine Hälfte der Zellen (ca. 50 Zellen) wurde auf neue Feederzell-Monolayer-Schalen eingesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Klone mit Hilfe von Trypsin/EDTA dissoziiert und in 24- bzw. 6-Well-Platten ausgesät. Bei jeder Passage wurden Kryokonserven der ES-Zellen angelegt.

Die andere Hälfte der Zellen wurde bei 3000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 20 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt und der Zellinhalt für 10 min bei 95°C denaturiert. Die anschließende Zugabe von 0,4 mg/ml (Endkonzentration) Proteinase K (55°C, 1h) inaktivierte alle Zellenzyme. Die Proteinase K wurde bei 95°C (10 min) inhibiert. Beim anschließenden PCR-Screening (2.3.6) wurden 5 µl eingesetzt.

### 2.3.6 Screening der ES-Zellen

Für das Screening der ES-Zellen wurde der Vorwärts-Primer so gewählt, dass er bereits im ursprünglichen Genom liegt, d. h. vor der 5'-Homologieregion des eigentlichen Target-Konstruktes. Der Rückwärts-Primer liegt in der Neomycin-Resistenz-Kassette. Ein positives Signal kann daher nur entstehen, wenn das Target-Konstrukt an der richtigen Stelle im Genom eingebaut wurde. Für die Optimierung der PCR musste zunächst ein Kontrollvektor hergestellt werden. Dieser Vektor besitzt nur die Sequenz der Neomycin-Resistenz-Kassette, die 1 kb große 5'-Homologieregion, vor der Neomycin-Resistenz-Kassette, sowie 53

zusätzlichen Basenpaare in Richtung 5'-Ende. Somit enthält er auch die Sequenz für den Vorwärts-Primer. Die Sensitivität der PCR wurde so weit optimiert, dass schon ein positiver Nachweis bei 5 fg DNA erfolgte. Die PCR-Komponenten: 1,7 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1x PCR-Puffer; 0,2 mM dNTP-Mix; 2,5 ng Primer A; 2,5 ng Primer Neo1L; 5  $\mu\text{l}$  DNA (aus den ES-Zellen); 2,5 U Taq-Polymerase. Der Ansatz wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die PCR wurde mit einem Hot-Start bei 94°C (5 min) begonnen. Dann folgte ein Schritt bei 93°C (1,5 min). Die anschließenden 35 Zyklen setzten sich aus einer Denaturierung von 94°C (45 s), einem Annealing bei 61,2°C (45 s) und einer Extension bei 72°C (1 min 50 s) zusammen. Die PCR wurde im Biometra T-Gradient Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

### 2.3.7 Proliferationstest mit ES-Zellen

Für die Proliferationsuntersuchung wurden am Tag 0 eine definierte Anzahl von Ahnak-Knock-Out- und Wildtyp-ES-Zellen in Kulturschalen mit Feederzell-Monolayer und ES-Zellmedium eingesät (2-3 x 10<sup>4</sup> bzw. 6-8 x 10<sup>4</sup> Zellen). Am 2. und 4. Tag wurde die Gesamtzellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dafür wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in 100  $\mu\text{l}$  ES-Zellmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 1:4 mit einer 0,5 %igen Trypanblau-Lösung angefärbt. Es wird die Lebendzellzahl (ungefärbt) der Zellen sowie die Anzahl der toten (blaugefärbten) Zellen bestimmt. Die Anzahl der vitalen Zellen/ $\mu\text{l}$  vom Tag 0 wurden auf 100 % gesetzt. Die Gesamtzellzahl vom 2. und 4. Tag wurde auf die Gesamtzellzahl vom 0. Tag bezogen und in % angegeben.

### 2.3.8 Isolation adulter Kardiomyozyten

Für die Untersuchung an adulten Mäuse-Kardiomyozyten, sowie für die Working-Heart-Versuche, stellte mir Herr Dr. Kouno (Kouno, 2004) sein Ahnak-Knock-Out-Maus-Modell mit dem entsprechendem Wildtyp zur Verfügung.

Männliche Ahnak-Knock-Out-Mäuse und die entsprechenden Wildtypen wurden im Alter von 6 Monaten mit einer intraperitonealen Injektion von 100 µl Xylanzinlösung (2%) und 100 µl Ketaminlösung (10%), sowie 100 µl Heparin (= 500 IE) anästhesiert. Die Herzen wurden sofort entfernt und in eine isotonische NaCl-Lösung gegeben. Über eine Kanüle wurden die Herzen mit einem Langendorff-Perfusionssystem verbunden und bei 37°C, mit Ca<sup>2+</sup>-freiem, Carbogen-begastem Krebs-Henseleit-Puffer (KHB: 127 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 24,8 mM NaHCO<sub>3</sub>; 8,3 mM Glucose; 20 mM BDM) perfundiert. Nach 5 min wurde die Perfusionslösung der Herzen gegen eine Enzymlösung ((100 ml KHB mit 0,04% Collagenase (Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ, USA), 0,2% BSA und 22,5 µmol/l CaCl<sub>2</sub>)) ausgetauscht, um den Zellverband aufzulösen. Nach weiteren 30 min sind die Herzen hell und weich. Die Ventrikel wurden mit einem Skalpell zerkleinert und in einen Trichter mit etwas Enzymlösung überführt. Nach Filtration durch ein Nylonnetz (Porengröße: 200 µm) und anschließender Zentrifugation, wurden die Zellen in einer Waschlösung (100 ml KHB; 0,23g BSA; 22,5 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde bei Raumtemperatur in drei Waschschritten für jeweils 3 min schrittweise auf 500 µmol/l erhöht, um Ca<sup>2+</sup>-tolerante Kardiomyozyten zu erhalten. Nach einem finalen Waschschriff wurden die Herzzellen in M199-Medium (0,2% BSA; 5% fetales Kälberserum; 5 mM Creatin; 5 mM Taurin; 2 mM L-Carnitin; 10 µM Cytosin-D-Arabinofuranosid und 20 mg/l Gentamycin) resuspendiert. Die Kardiomyozyten wurden in laminierten 4-Well-Kammern (Nunc, Wiesbaden-Schierstein, Deutschland), speziell für Kontraktionsmessungen, ausgesät.

### 2.4 Untersuchung der Kontraktion und des intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten

Die Kardiomyozyten wurden mit Hanks-Balance-Salz-Lösung (HBSS) gepuffert und mit 10 mM Hepes Puffer (pH 7,4) gewaschen. Dann wurden sie mit Fura-2-Acetoxymethyl-Ester für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen für 15 min in reiner HBSS belassen. Die intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten, mit einer klaren Querstreifung, wurden analysiert. Die Zellverkürzung und das Fura-2-Signal wurden gleichzeitig, bei 30°C, in einem Ionoptix Kontraktions- und Fluoreszenzsystem (Ionoptix, Milton, MA, USA) gemessen. Die Zellen wurden im elektrischen Feld mit bipolaren Pulsen von 1 Hz für die Dauer von 5 ms stimuliert. Nach Einstellen einer gleichmäßigen Kontraktionsrate wurde 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin zugegeben, um die Zellen  $\beta$ -adrenergen zu stimulieren. Die Zellverkürzung wurde mit der Video-Edge-Technik mit einer Rate von 240/s gemessen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten wurden bei einer Emissions-Wellenlänge von 510 nm aufgezeichnet, die man bei einer Anregungs-Wellenlänge von abwechselnd 340nm und 380 nm (Ratio von 340/380) erhält. Daten von 15, aufeinanderfolgenden Kontraktionen wurden als Intervalle aufgezeichnet. Für die weitere Analyse wurde der Mittelwert ermittelt.

### 2.5 Working-Heart-Methode

Bei der Working-Heart-Methode werden isolierte Mäuseherzen antegrad über den linken Vorhof perfundiert. Die Herzen werfen ein Schlagvolumen aus und bauen einen aortalen Druck gegen einen vorgegebenen Widerstand (Nachlastdruck) auf. Da sie Druck-Volumen-Arbeit verrichten, werden sie international als „Working-Heart“ bezeichnet (Schulz, 1995).

In diesem Versuch wurden Ahnak-Knock-Out-Mausweibchen (5 Monate alt), (N=4) und zur Kontrolle der entsprechende Wildtyp (N=4) verwendet. Die Mäuse wurden mit 4% Chloralhydrat (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) anästhesiert. Zur Vorbeugung der Blutgerinnung wurde Heparin-Natrium-25000-Lösung (Ratiopharm, Deutschland) eingesetzt. Die Herzen wurden unverzüglich entnommen und in eiskalte heparinisierte Perfusionsflüssigkeit gelegt. Die Aorta wurde von Fett- und Bindegewebe freigelegt, das Herzgewicht bestimmt und anschließend in der Aorta eine Kanüle ( $\varnothing$  1 mm) fixiert. Das Herz wurde dann an der Perfusionsapparatur (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) befestigt (Abb. 2.1). Sofort wurde eine retrograde Perfusion (Langendorff-Methode) mit warmen Perfusionspuffer, bei einem konstanten hydrostatischen Druck von 50 mmHg, gestartet. Durch die Erwärmung begann das Herz unverzüglich zu schlagen. Die geöffnete Lungenvene wurde durch eine Kanüle ( $\varnothing$  1 mm) mit einem Vorrat an modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung (118 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 mM Na-EDTA; 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 5,5 mM Glucose) verbunden. Der Puffer wurde mit einem konstanten Druck von 10-11 mmHg (Vorlastdruck) in das linke Atrium geleitet.

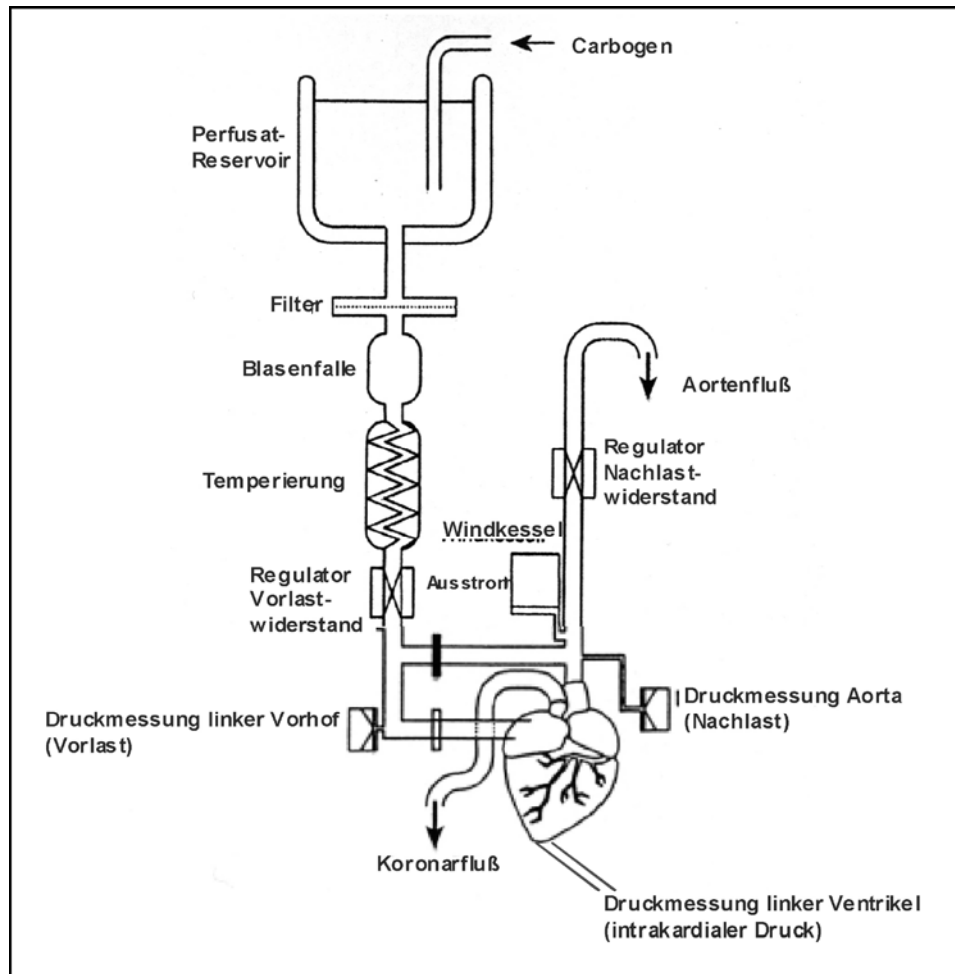


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Perfusionsapparatur. Um die Präparation im Langendorff-Modus zu beginnen, ist der Bypass im Working-Heart-Modus unterbrochen (schwarzer Balken) (Schulz, 1995).

Die KH-Lösung wurde mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> durch eine Glasfritte equilibriert und auf konstanten 37°C temperiert. Nach durchschnittlich 5 min wurde vom retrograden zum antegraden Perfusionsmodus gewechselt und der weitere Versuchsablauf im Working-Heart-Modus durchgeführt. Die KH-Perfusionslösung verließ den linken Ventrikel durch die Aortenkanüle, die mit einer Druckkammer verbunden war. Eine Kanüle (Ø 0,4 mm) wurde in den linken Ventrikel injiziert. Das Ende der Kanüle war mit einem Druckwandler (Transducer) verbunden. Das Signal des intrakardialen (IC) Druckes wurde permanent, während des gesamten Versuches, registriert und abgespeichert. Der entwickelte intrakardiale Druck ist die Differenz zwischen intrakardialem systolischem und diastolischem Druck. Nachdem sich das Herz gleichmäßig auf seiner

Eigenfrequenz eingeschlagen hatte, wurde es elektrisch stimuliert, so dass die untersuchten Herzen alle eine Frequenz im Bereich von  $385,96 \pm 12,25$  bpm hatten und somit vergleichbar waren. Nach einer Einschlagphase von ca. 5 min wurde der Vorlastdruck von 10 mmHg stufenweise, in 2 mmHg Schritten (für jeweils 2 min), auf 20 mmHg erhöht. Anschließend wurde die Vorlast wieder auf 10-11 mmHg reduziert und es folgte eine erneute Einschlagphase für 5 min. Die darauffolgende,  $\beta$ -adrenerge Stimulierung wurde durch Zugabe einer 10  $\mu$ M Isoprenalin-Lösung (Iso-Lösung) ausgelöst. Die Iso-Lösung wurde über eine Infusionspumpe mittels eines Kathethers der KH-Perfusionslösung, noch vor der Vorhofkanüle, beigemischt. Es ergab sich eine Endkonzentration von 1  $\mu$ M. Die Herzen wurden bis zur Plateauphase (2 min) stimuliert und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Signale (Vor- und Nachfluß, Vorlast- und Nachlastdruck und intrakardialer Druck) wurden mit der Software HEM (Version 3.2, Notocord Systems, Paris, Frankreich) aufgezeichnet. Aus den digitalisierten Signalen wurden folgende Parameter ermittelt: Herzfrequenz, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, intrakardialer Druck, diastolischer Druck, enddiastolischer Druck und entwickelter linksventrikulärer Druck.

Herzen, die Überschreitungen in der Präparationszeit oder Arrhythmien, innerhalb der ersten 5 min der Äquilibrierungsphase durch fehlerhafte Präparation an der Aorta oder des linken Atriums aufwiesen, wurden von der Endanalyse ausgeschlossen.



### 2.6 Mutations-Screening

Für das Mutations-Screening wurden 192 unabhängige Patienten, bei denen hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) und dilatative Kardiomyopathie (DCM) diagnostiziert wurden, nach vorausgegangenem Einverständnis, genotypisiert. Weiterhin wurde die Allel-Frequenz bei 96 gesunden, nichtverwandten Kontrollpersonen getestet, um sicher zu stellen, dass die identifizierten Varianten tatsächlich HCM-spezifische Mutationen sind. Die Proben wurden von der Blutbank des Institutes für Hämatologie/Onkologie, Charité, Berlin zur Verfügung gestellt.

Insgesamt wurden 7 überlappende Fragmente, die den ganzen C-Terminus des Ahnak-Gens umfassen, mit 7 Primerpaaren (2.1.2, T0 fw/rev – T6 fw/rev) analysiert. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 60 ng genomische DNA; 10 pmol Vorwärts- und Rückwärts-Primer; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCL (pH 8,3); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 800µM dNTP-Mix und 0,5 U Taq-DNA-Polymerase, in einem Reaktionsvolumen von 25 µl. Die Reaktion wurde mit den folgenden Schritten, im Thermocycler GenAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Cetus), durchgeführt: Nach dem ersten Denaturierungsschritt von 94°C, für 5 min folgten 35 PCR-Zyklen bestehend aus: Denaturierung bei 94°C (30 s), Annealing bei 60-62°C (30 s) und einer Kettenverlängerung bei 72°C (1 min und 50 s). Nach einem abschließenden Extentionsschritt bei 72°C (10 min) wurden die PCR-Amplifikate auf einem Agarosegel (2 %), in der Gelelektrophorese (20 min, 120 V) kontrolliert. Für die PCR wurden die Chemikalien der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland), wenn nicht anders angegeben, benutzt. Nach der PCR wurden die Proben mittels SSCP (Single-Strand-Conformational-Polymorphism) gescreent. Dazu wurde das PCR-Produkt (4 µl) mit 6 µl 0,0125 % Bromphenol-blau (enthielt zusätzlich Formamid) und 0,75 % Ficoll 400 (gelöst in 1X TBE) vermischt und für 5 min bei 96°C denaturiert. Die Proben wurden zum Abkühlen auf Eis gestellt und dann auf ein 10 %igem Polyacrylamid-Gel (49:1 Acrylamid : Bisacrylamid, 110

mm x 120 mm x 1,0 mm, Multigel-Long/Biometra) geladen. Die SSCP-Analyse wurde für 16-18 h, einmal bei 6 V/cm, bei Raumtemperatur und bei 7V/cm, bei +4°C (Erdmann, 1996) durchgeführt. Die Banden wurden mit der Silberfärbung (Budowle, 1991) sichtbar gemacht. Die SSCP-Analyse von PCR-Produkten verschiedener Probanden ermöglicht es, innerhalb des selben Genabschnittes unterschiedliche Allele zu identifizieren. Die Sequenzierung erfolgte mit dem BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, mit dem ABI PRISM 310 DNA sequencing system (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Die SSCP-Analyse und die DNA-Sequenzierung wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Vera Regitz-Zagroseks (Deutsches Herzzentrum Berlin/Universitätsmedizin Charité Berlin) durchgeführt.

### 2.6.1 Mutagenese

Die Einführung von Punktmutationen wurde mit dem QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von StratageneEurope (Amsterdam, Niederlande), nach Angaben des Herstellers, ausgeführt. Die Punktmutationen: I5236T, T5549M und P5544/5547A wurden in den pGEX- 4T1 Vektor, der zum Einen den C1-Terminus und zum Anderen den Genabschnitt P3-P4 des Ahnak-Gens beinhaltet, eingefügt. Diese pGEX-4T1 Vektoren wurden freundlicherweise von Annette Hohaus (MDC, Berlin-Buch, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Für die Mutagenesereaktion wurden: 5 µl 10x Reaktionspuffer; 5 µl (50 ng) Template pGEX-4T1 Ahnak-C1 bzw. Ahnak P3-P4; 1,25 µl (125 ng) Vorwärts-Primer; 1,25 µl (125 ng) Rückwärts-Primer; 1 µl dNTP-Mix (aus dem Kit) eingesetzt. Zum Einfügen der Mutationen wurden drei verschiedene Amplifizierungen mit jeweils anderen Primerpaaren: Ahnak-C1 I5236T fw/rev, Ahnak P3-P4 T5549M fw/rev und Ahnak P3-P4 P5544/5547A fw/rev (2.1.2), durchgeführt. Vor dem Start wurde zu jedem Reaktionsansatz 1 µl *Pfu Turbo* DNA-Polymerase (2,5 U/µl) hinzugefügt, die, aufgrund ihrer 3'-5'-

"proofreading-Funktion", eine 6-fach höhere Polymerisationsgenauigkeit hat. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen im Biometra T-Gradient Thermoblock (Biometra, Deutschland) durchgeführt: Nach dem initialen Denaturierungsschritt von 95°C (30 s) folgten 12 PCR-Zyklen, bestehend aus: Denaturierung bei 95°C (30 s), Primerhybridisierung bei 55°C (1 min) und Polymerisation bei 68°C (1 min/kb Plasmid, d.h. 7 min Mutagenesereaktion pGEX-4T1). Nach der Amplifizierung wurde die DNA für 1 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (1 µl, 10 U/µl) hydrolysiert. Das Restriktionsenzym *DpnI* schneidet die Parental-DNA spezifisch (an der Sequenz 5'-G<sup>m</sup>ATC-3'), die bei fast allen *E. coli*-Stämmen DAM-methyliert ist. Die DAM-Methylierung transferiert eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die N6-Position der Adenin-Reste, in der Sequenz GATC, die bei einem GC-Gehalt von 50 % durchschnittlich einmal pro 256 bp vorkommt. Den, in der Mutagenese-Reaktion, neu synthetisierten DNA-Strängen fehlt diese DAM-Methylierung, so daß sie nicht hydrolysiert werden. Superkompetente Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue wurden mit 1 µl des *DpnI*-behandelten Mutagenese-Ansatzes transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Platten (Ampicillin) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Von 10 gewachsenen Klonen wurde das Plasmid isoliert (2.2.9) und das Insert durch die Restriktion (2.2.10) mit dem Enzym *A/wNI* (10 U/µl, New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus, Deutschland) bzw. *BstXI* (10 U/µl, New England Biolabs GmbH) kontrolliert. Bei der Mutagenese-Reaktion wurde im Ausgangsplasmid pGEX-4T1 Ahnak-C1 eine zusätzliche *A/wNI*-Schnittstelle und in Ahnak P3-P4 eine *BstXI*-Schnittstelle eingefügt. Somit konnten die Inserts ausgewählt werden, die eine Punktmutation enthielten. Die Inserts wurden mit den Primern: 5'-pGEX Sequencing Primer und 3'-pGEX Sequencing Primer sequenziert und der Inhalt der eingefügten Mutation überprüft. Dabei konnte die Fehlerfreiheit der Sequenz des restlichen Gens bestimmt werden.

### 2.6.2 Klonierung der GST-Fusionsproteine

Die Klonierung der Ahnak-Fragmente C1 und P3-P4 in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-4T1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) ist die Voraussetzung für die Expression der entsprechenden GST-Fusionsproteine. Die Fusionsproteine: Ahnak-C1, Ahnak P3-P4, sowie die  $\beta 2$ -Untereinheit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals, wurden freundlicherweise von Dr. Annette Hohaus (Hohaus, 2002; Alvarez, 2004) zur Verfügung gestellt. Der Einbau der natürlich vorkommenden Punktmutationen und der Ala-Scan und damit die Herstellung der Expressionsvektoren: pGEX-4T1 Ahnak-C1 I5236T, Ahnak P3-P4 T5549M und Ahnak P3-P4 P5544/5547A, erfolgte mit dem QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von StratageneEurope (Amsterdam, Niederlande), nach Angaben des Herstellers (2.4.1). Die  $\beta 2$ -Untereinheit wurde, wie unter 2.4.4 und 2.4.6 beschrieben, expremiert und phosphoryliert.

### 2.6.3 Klonierung der His-Tag-Fusionsproteine

Für die Klonierung der Plasmide Ahnak-C1/C wt und Ahnak-C1/C I5236T, die den Teil des C-Terminus expremieren, wurde als Template die aufgereinigte DNA von Ahnak-C1 und Ahnak-C1 I5236T verwendet. Dazu wurden spezifische Primer (2.2.4) hergestellt, die die Schnittstellen *Bam*HI-*Hind*III enthalten, um ein späteres Subklonieren in den His-Tag-Expressionsvektor pRSET A (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zu erleichtern. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen: *Bam*HI und *Hind*III (New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland) hydrolysiert (2.2.10). Die Insertion dieser Fragmente erfolgte in den, mit *Bam*HI und *Hind*III geöffneten, pRSET A-Vektor. Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (New England BioLabs) erfolgte die Ligation (2.2.7) der beiden PCR-Fragmente mit dem His-Tag-Vektor. Die PCR wurde unter folgenden

Bedingungen durchgeführt: 5 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl<sub>2</sub>; 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 0,5 µl (250ng) Ahnak-C1 bzw. Ahnak-C1/I5236T; 1 µl (50 ng) Primer C1mut<sub>γ</sub> fw (5´- *ttggatccAAAGGGAGCCTT*-3´); 1 µl (50 ng) Primer C1mut<sub>δ</sub> rev (5´- *ccaagcttGACATGGAAACC*-3´); 1 µl dNTP-Mix (Qbiogene, Heidelberg, Deutschland); 0,5 µl Taq-Polymerase; 39,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen im Biometra T-Gradient Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt: Nach dem initialen Denaturierungsschritt von 94°C für 3 min folgten 30 PCR-Zyklen, bestehend aus: Denaturierung bei 94°C (1 min), Primerhybridisierung bei 60°C (1 min) und Kettenverlängerung bei 72°C (1 min und 50 s). Alle Chemikalien und die Taq-Polymerase wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

### 2.6.4 Expression von GST- und His-Tag-Fusionsproteinen

Für die Herstellung der Fusionsproteine mussten die pGEX- bzw. His-Tag-Konstrukte in einem speziellen, für die Proteinexpression geeigneten, Bakterienstamm transformiert werden. Es wurden kompetente Zellen des Stammes BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (StratageneEurope, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Die effiziente Produktion von heterologen Proteinen wird in diesen Zellen durch eine erhöhte t-RNA-Produktion garantiert. Bei konventionellen Bakterienstämmen kommt es im Verlauf der Expression, aufgrund einer limitierten t-RNA-Produktion, zum Stillstand der Proteinexpression.

Die Transformation der pGEX- und His-Tag-Konstrukte wurde wie folgt durchgeführt: 100 µl Bakterien wurden mit 2 µl β-Mercaptoethanol (1:10 verdünnt, StratageneEurope) für 10 min auf Eis inkubiert, anschließend wurden 1 - 50 ng Plasmid-DNA dazu gegeben und für weitere 30 min auf Eis gestellt. Für die Aufnahme der Plasmid-DNA wird die

Bakteriensuspension für 20 sec auf 42°C erhitzt. Danach wurde die Suspension für 2 min auf Eis abgekühlt und in 900 µl SOC-Medium überführt. Die Bakterienzellen wurden bei 37°C und für 1 Stunde im Schüttler (250 rpm) inkubiert. Anschließend werden sie in einem geeigneten Volumen (100-150 µl) auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (100 µg/µl) ausgestrichen und bei 37°C, über Nacht, inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden einzeln in 100 ml LB-Medium (Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 50 µg/ml) aufgenommen und im Schüttler (280 rpm, 37°C) für 12 bis 14 Stunden vermehrt. Dieser Ansatz wurde in Ampicillin-haltigem LB-Medium (1:10) erweitert und bei 37°C geschüttelt, bis sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden ( $OD_{600}$  von 0,5-0,6). Dann wurde die Proteinexpression der Bakterien mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden für weiter 5 bis 6 Stunden bei 300 rpm, in der Regel bei 37°C, inkubiert und anschließend der Überstand abzentrifugiert(4°C).

### 2.6.5 Isolierung und Reinigung der Fusionsproteine

Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 4°C zentrifugiert (8100 rpm, Beckman-Rotor JLA-10.500) und das Bakterienpellet in 20 ml Puffer (10 mM Tris; pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA mit 0,1 mM PMSF; 1 µM Pepstatin A; 0,1 mM Benzamidine; 1 mM Jodacetamid; 1%iges Triton; 2 mM Dithiothreitol) resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde durch Ultraschallwellen mit dem Sonikator (SonoPlus HD70, Bachofer Laboratoriumsgeräte), für 2 x 45 sec mit Ultraschallstößen (Powerlevel 70 %, Zyklus 70) durchgeführt. Die Zelltrümmer wurden in einem Beckman JA-20 Rotor (10.000 rpm, 30 min, 4°C) abzentrifugiert. Der Überstand, der die GST-Fusionsproteine enthält, wurde vorsichtig auf Glutathion-S-Transferase Beads (1 ml gequollenes Gel) gegeben. Nach dem Rotationsrad (1 h, 4°C) wurden die, an die GST-Beads gebundenen, GST-Fusionsproteine mit eiskaltem STE-Puffer (150 ml) gewaschen. Die Elution der Ahnak- und der

$\beta$ 2-GST-Fusionsproteine erfolgte mit einer 20 mM Glutathionlösung (gelöst in 0,1%igem, CHAPS-haltigem Bicarbonatpuffer; pH 9,2). Die His-Tag-Fusionsproteine wurden wie die GST-Fusionsproteine aufgereinigt. Allerdings erfolgte die Bindung der His-Tag-Fusionsproteine an Nickel-NTA Agarose Beads (QIAGEN, Hilden, Deutschland), für 90 min auf einem Rotationsrad bei 4°C. Die anschließende Elution erfolgte in 250 mM Imidiazolpuffer (gelöst in 1X PBS, pH 8). Zur Kontrolle der Expression wurden die Fusionsproteine auf einem 10%igem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch Coomassie-Blue angefärbt.

### 2.6.6 Phosphorylierung der Fusionsproteine

Für die Phosphorylierung wurden die Fusionsproteine (200  $\mu$ g) mit 40 mM Hepes/Tris-Puffer (10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM EDTA; 10  $\mu$ M [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP und 0,5  $\mu$ M PKA; pH 7,4) versetzt und für 10 min bei 30°C inkubiert. Das phosphorylierte Protein wurde anschließend im Probenpuffer (500 mM NaCl und 50 mM Tris, pH 7,4) für die Ultrazentrifugation oder im Laufpuffer für die BIAcore- Bindungsstudien (1X PBS), mit der Sephadex™ G-25 M Säule (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden), umgepuffert.

### 2.6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Transfer

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), (Laemmli, 1970). Das Trenngel bestand aus 6,5%igem Acrylamid, 50%igem Trenngel-Puffer (0,375 M Tris; pH 8,8 und 0,1%igem SDS), 0,7%igem Temed und 1,4%igem Amoniumpersulfat. Das Sammelgel bestand aus 4%igem Acrylamid, 50%igem Sammelgel-Puffer (0,125 M Tris; pH 6,8 und 0,1%igem SDS),

1%igem Temed und 2%igem Amoniumpersulfat. Es wurden Proben mit 5 - 20 µg Proteingehalt aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 mV in einem Puffer, bestehend aus: 0,025 M Tris; 0,192 M Glycerin und 0,1%igem SDS. Die Proteine wurden entweder mit Coomassi-Blue, direkt im Gel (10 min) angefärbt oder auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C, Amersham, Braunschweig, Deutschland) transferiert. Dazu wurde eine Naßblotapparatur (BioRad, München, Deutschland) verwendet. Das Blotten der Proteine auf die Membran erfolgte für 2 Stunden bei 210 mA. Der verwendete Puffer bestand aus: 0,04 M Tris; 0,306 M Glycerin; 0,1%igem SDS und 20%igem Methanol. Die Proteine wurden anschließend in einer Ponceau-S-Lösung angefärbt. Es wurde der Roti-Mark Standard Molekulargewichts-Marker (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

### **2.6.8 Immunofärbung der Proteine nach dem Western-Transfer**

Der Nachweis der geblotteten Proteine erfolgte durch Immunodetektion mit einem spezifischen Ahnak-Antikörper gegen die N-terminale Ahnak-Kopfregion (Head). Es wurde ein polyklonaler, isoform-spezifischer Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Dazu wurde eine spezifische Peptidsequenz (aus der N-terminalen Ahnak-Kopfregion) von der Firma Biosynthan (Berlin-Buch, Deutschland) synthetisiert und in weiße Neuseeland-Kaninchen injiziert. Die gebildeten Antikörper wurden aus dem Serum der immunisierten Tiere aufgereinigt. Die geblotteten Proteine wurden mit dem spezifischen Kaninchen-Antikörper 90 min und bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dem sekundärem Anti-Kaninchen-Antikörper (Anti-Rabbit-IgG, Verdünnung 1:10.000), der sich am Primär-Antikörper spezifisch bindet, wurde die Membran eine Stunde und bei Raumtemperatur, inkubiert. Der Sekundär-Antikörper ist mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Die Immunoreaktion des Sekundär-Antikörpers kann mit einer Chemolumineszenz-Reaktion nachgewiesen werden. Dazu wurde die Membran nach Angaben des Herstellers behandelt



(ECL, Amersham, Braunschweig, Deutschland). Anschließend wurde ein Röntgenfilm (X-Omat, Kodak) auf die Membran gelegt. Die Belichtungszeiten lagen zwischen 0,5 und 5 min.

### 2.7 Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation untersucht die Bewegung oder Konzentrationsverteilung gelöster Makromoleküle, unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte. Sie fraktioniert im Schwerfeld unterschiedliche Komponenten nach Teilchengröße, Teilchendichte und Form. Der Sedimentationsprozeß wird optisch detektiert. So ist es möglich, während der Zentrifugation, Messungen der lokalen Makromolekül-Konzentrationen (oder der damit zusammenhängenden Größen) durchzuführen. Die Messgröße ist dabei die Absorption der gelösten Makromoleküle, die in einem proportionalen Verhältnis zur Molekülkonzentration steht. Für die analytischen Ultrazentrifugationsversuche wurde das Modell Optima XL-A (Beckman, Palo Alto, CA, USA) verwendet. Die Sedimentations-Gleichgewichts-Läufe wurden in 6-Kanal-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit jeweils drei unterschiedlichen Konzentrations-Paaren der, zu messenden Proteine (~ 70 µl) befüllt. Die Proben wurden erst für 2 h bei 16000 rpm und anschließend für 30 h bei 12000 rpm (10°C) zentrifugiert. Die Molekulargewichtsverteilung wurde bei drei verschiedenen Wellenlängen zwischen 240 und 295 nm gemessen. Aus den Konzentrationsprofilen wurden die Molmassen der einzelnen Komponenten und die gebildeten Assoziate abgeleitet. Mit Hilfe des Polymole Programms (Behlke, 1997) wurde der  $K_D$ -Wert des Proteinkomplexes zwischen der  $\beta 2$ -Untereinheit und den Ahnak-Fusionsproteinen ermittelt.

## 2.8 Bindungsstudien mit BIAcore

Das BIAcore-System nutzt die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) um Interaktionen zwischen Molekülen aufzuzeichnen. Einer der Interaktionspartner wird auf der Oberfläche eines Sensorchips immobilisiert (Ligand), während der andere Partner (Analyt), gelöst in einem Laufpuffer, über die Oberfläche, mit einer konstanten Flussrate, durch ein Mikroflussskanalsystem; injiziert wird. Die Veränderung in der Massenkonzentration, auf der Oberfläche des Sensorchips, ist die Konsequenz von Assoziation und Dissoziation zwischen Analyt und Ligand und wird, in Abhängigkeit von der Zeit, als Sensorgramm graphisch dargestellt.

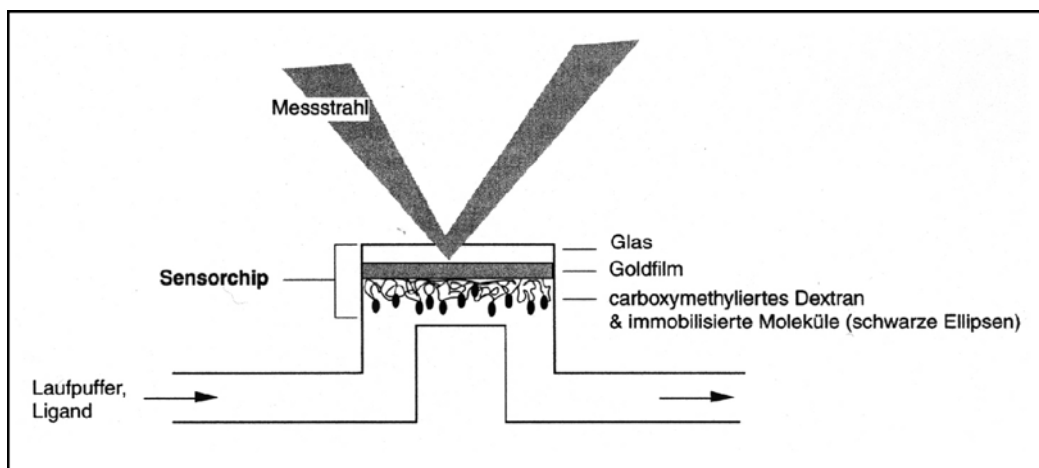


Abb. 2.2: Der Kern der BIAcore-Apparatur. Der Sensorchip misst die Massenzunahme auf der Dextranschicht. Der Chip liegt oben, um Sedimentationsartefakte zu vermeiden: Das Sediment fällt nach unten und verfälscht so das Signal nicht (Rehm, 2002).

Mit Hilfe der Plasmon-Resonanz lässt sich die Veränderung der Massenkonzentration, durch den Brechungsindex einer dünnen Schicht, über dem Goldfilm bestimmen. Der Brechungsindex wiederum hängt von der Proteinmasse in der Schicht ab. Die Zunahme der Proteinmasse in der Messschicht kann optisch verfolgt werden. Den Ablauf einer solchen Bindung zeigt Abb. 2.3.

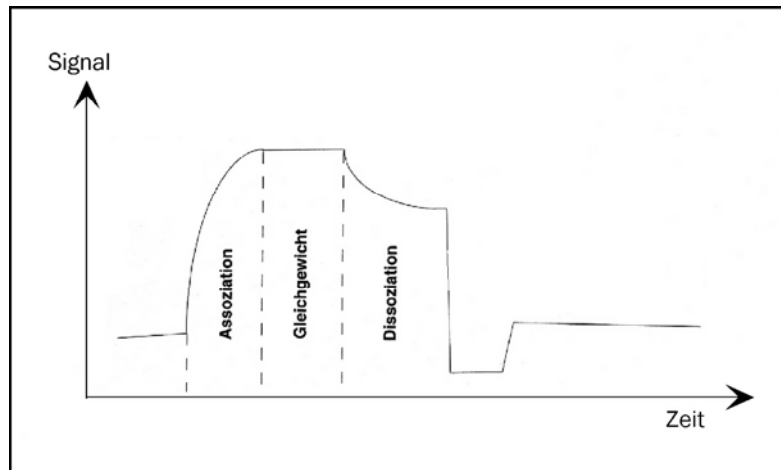


Abb. 2.3: Versuchskreislauf mit BIAcore: Im ersten Schritt wird Laufpuffer über den Chip gegeben und die Nulllinie definiert. Dann folgt eine Phase, in der eine definierte Menge des Liganden dem Laufpuffer zugegeben wird. Die Höhe der Bindungskurve zeigt die Menge des gebundenen Proteins. Nach Erreichen des Gleichgewichtes wird die Dissoziation durch reine Pufferlösung eingeleitet. Abschließend wird ein Regenerationspuffer verwendet, um den Chip von den gebundenen Liganden zu befreien, (Rehm, 2002)

In dieser Arbeit wurde die BIAcore 2000 Apparatur (BIAcore, Upsala Schweden) verwendet. Die Ahnak-Fusionsproteine Ahnak-C1 wt und Ahnak-C1/C 15236T wurden als Liganden an der Dextran-Oberfläche des Sensorchips (CM5, BIAcore AB), jeweils auf unterschiedlichen Spuren, immobilisiert (3,2 ng/mm<sup>2</sup>). Die Liganden wurden dafür in einer 10 mM Na-Acetat Lösung (pH 5,5), mit einer Konzentration von 0,15 mg/ml, gelöst. Eine Spur auf dem Chip diente als Nullwertkontrolle (Blank). Dafür wurden 35 µl einer 1:2 Mischung aus N-Hydroxysuccinimid (NHS, 100 mM) und N-Ethyl-N'-(3 dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC, 400 mM), mit einer Flussrate von 5 µl/min, über den Chip geleitet. Nach der Immobilisierung wurden alle Spuren durch die Injektion einer 1 M Ethanolamin-Lösung (35 µl; pH 8,5) geblockt. Dadurch sollen unspezifische Bindungen zwischen der Dextran-Oberfläche des Sensorchips und dem Analyt verhindert werden. Die  $\beta$ 2-Untereinheit wurde als Analyt (phosphoryliert und nicht phosphoryliert), mit einer Flussrate von 8 µl/min, bei 25°C, über den Ahnak-immobilisierten Chip injiziert. Der Analyt war in unterschiedlichen Konzentrationen im Laufpuffer (1X PBS, 5

$\mu\text{M}$  –  $11 \mu\text{M}$ ) gelöst. Die Nullwertkontrolle wurde von den Werten der Sensorgramme mit Ahnak-C1/C und Ahnak-C1/C I5236T abgezogen. Der Regenerationspuffer bestand aus 200  $\mu\text{l}$  einer 200 mM NaCl-Lösung, 50  $\mu\text{l}$  einer 50 mM NaOH-Lösung und 50  $\mu\text{l}$  Lösung D (0,3%iges CHAPS; 0,3%iges Gemisch aus 3-12; 0,3%igen Tween 80; 0,3%iges Tween 20 und 0,3%iges Triton X-100), bezogen von BIAcore AB. Der Regenerationspuffer wurde für 1-2,5 min, mit einer Flussgeschwindigkeit von 8  $\mu\text{l}/\text{min}$ , über den Chip injiziert, bis der Ausgangswert wieder erreicht wurde.

Für die Datenanalyse wurde das BIAevaluation 3.2 RC 1 Programm (BIAcore AB) verwendet. Die gemessenen Daten wurden mit Hilfe eines Single-Site-Interaktionsmodells gefittet. Die Software korrigiert den systematischen Drift in der Basallinie, der während der Messung auftritt.

### 2.9 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der digitalisierten Signale, aus der Untersuchung der Kontraktion und des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, aus dem Working-Heart, der Ultrazentrifugation, sowie der BIAcore-Bindungsstudien erfolgte anschließend über ein Kalkulationsprogramm (Excel 2000, Microsoft). Die, unter konstanten Bedingungen gesammelten, Einzeldaten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM zusammengefasst und angegeben.

Um statistisch signifikante Unterschiede der Daten zu analysieren wurde der ungepaarte t-Test, mit dem Programm Prism, (Version 2.01, GraphPad Software Inc.) durchgeführt.

## 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die funktionelle Bedeutung von Ahnak im Herzen auf zwei verschiedene Arten untersucht. Zum einen durch Ahnak-Defizienzmodelle in Zellen und Organen und zum anderen durch Mutagenese des Ahnak-Gens.

### 3.1 Ahnak-Defizienzmodelle

#### 3.1.1 Genstruktur

Zu Beginn dieser Arbeit lag nur die Sequenz für das humane Ahnak-Gen vor (Shtivelman, 1992). Das humane Ahnak-Gen ist auf dem Chromosom 11q12 lokalisiert und kodiert 5643 Aminosäuren (Accession-Nummer: AC004230), (Kudoh, 1995). In der Maus war ein partieller Teil der cDNA, der für Desmoyokin kodiert (Hashimoto, 1993) und ein kurzer „Expressed Sequence Tag (EST)“ (AV319108), der zur Translationsstartregion des humanen Ahnak-Gens homolog ist, bekannt. Daher mussten große Teile des 5'-Endes und des 3'-Endes der Maus-Ahnak-Sequenz aufgeklärt werden. Für die Aufklärung des 5'-Endes wurde eine PCR mit den bekannten Primern EST1 und opt1rev durchgeführt. Es ergab sich eine 826 bp-große Bande (siehe Abb. 3.1). Durch Sequenzierung dieses PCR-Fragmentes wurde die Lücke zwischen EST zum Maus-Desmoyokin geschlossen und es war möglich neue Vorwärts-Primer (A und A<sub>1</sub> fw) für die Herstellung der 5'-Homologieregion (kurzer Arm, ca. 1000 bp) zu designen.

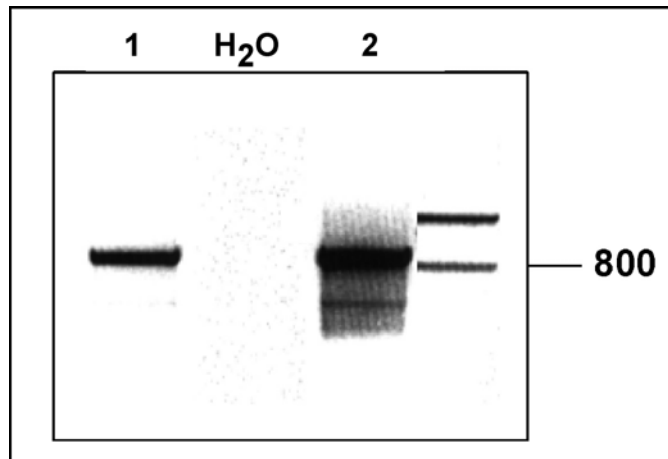


Abb. 3.1: Kontroll-PCR der 5'-Homologieregion. Dargestellt sind die 826 bp-großen Banden, die mit den Primern EST1 und opt1 rev amplifiziert wurden. Amplifiziert wurde die DNA aus ES-Zellen (1) und die genomische DNA vom Mäusestamm 129sv (2). Als Negativkontrolle diente H<sub>2</sub>O.

Für die Gensequenz-Aufklärung der 3'-Homologieregion (langer Arm, ca. 5000 bp) wurde ein Bibliotheken-Screening durchgeführt. Die Gen-Bibliotheken stammten vom RZPD. Im ersten Gen-Bibliotheken-Pool (Library RPCI21 Mouse Pac, Library No: 711) konnten 3 positive Klone: RPCIP711PP16, RPCIP711PP24 und RPCIP711PP78 ermittelt werden (siehe auch Anhang Abb. 7.1). Die PCR, die mit den Primern: opt1 fw und opt2 rev durchgeführt wurde, ergab für die oben genannten drei Klone eine Größe von 657 bp.

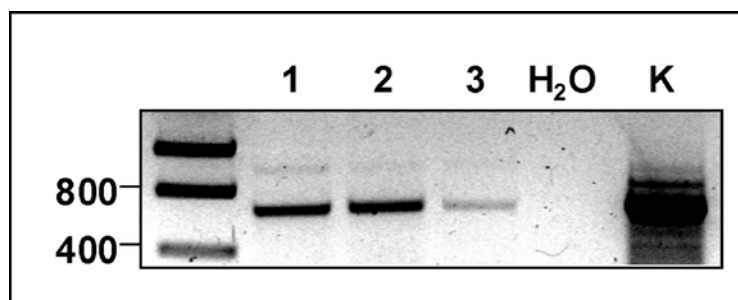


Abb. 3.2: Screening des ersten Gen-Bibliotheken-Pools. Zu sehen sind die 657 bp-großen Banden der drei positiven Klone: RPCIP711PP16 (1), RPCIP711PP24 (2) und RPCIP711PP78 (3). Als Positivkontrolle (K) diente die genomische DNA des Mäusestammes 129sv. Als Negativkontrolle diente H<sub>2</sub>O.

Beim zweiten Gen-Bibliotheken-Pool handelte es sich um 3 Platten, á 48 Klone. Jeder positive Klon aus dem ersten Gen-Bibliotheken-Screening erhielt eine Platte. Nach erneutem Durchführen einer PCR mit den Primern: opt1 fw und opt2 rev konnten wiederum 3 Klone, pro Platte (siehe Anhang Abb. 7.2-

Abb. 7.3), mit einer Bandengröße von 657 bp detektiert werden und so die Koordinaten für die x-, y- und z-Ebene der Einzelklone ermittelt werden.

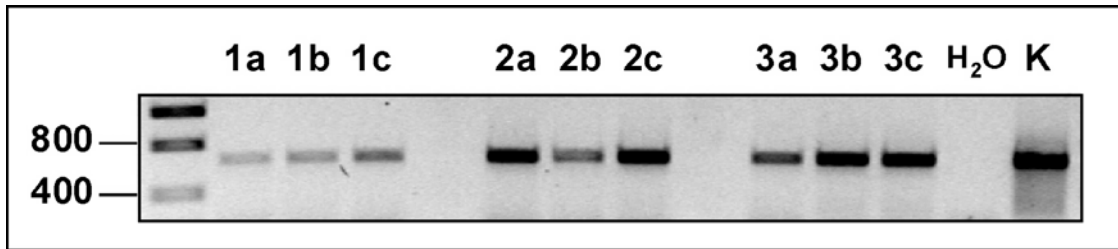


Abb. 3.3: Screening des zweiten Gen-Bibliotheken-Pools. Zu sehen sind die 657 bp-großen Banden der neun positiven Klone. Für den Klon RPCIP711PP16 (1a-c) wurden die drei Klone P127 (1a), PP16-15 (1b) und PP16-38 (1c) detektiert. Bei dem Klon RPCIP711PP24 (2a-c) handelte es sich um die Klone P189 (2a), PP24-8 (2b) und PP24-29 (2c). Beim dritten, positiven Klon RPCIP711PP78 (3a-c) konnten die Klone P624 (3a), PP78-1 (3b) und PP78-29 (3c) amplifiziert werden. Die genomische DNA des Mäusestammes 129sv diente als Positivkontrolle (K) und H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle (siehe Anhang 7.2 und 7.3).

Die Ahnak-Maussequenz, die durch die PCR-Analysen und beim Gen-Bibliotheken-Screening entschlüsselt wurde, ist im Anhang Abb. 7.7 dargestellt.

#### 3.1.2 Erzeugung des Ahnak-Target-Konstruktes

Das Target-Konstrukt enthält die gesamte 5'-Region, einschließlich potentieller Translationsstartstellen des Ahnak-Gens, die deletiert werden sollen. Mit Hilfe der Long-Range-PCR konnten 1 kb- bzw. 5 kb-lange DNA-Fragmente des Ahnak-Gens amplifiziert werden, die anschließend in den pTV0-Vektor kloniert wurden. Hier flankieren die DNA-Fragmente eine Neomycin-Resistenz-Kassette (neo), die ein starkes Transkriptionsstoppsignal in das Gen einführt (Abb. 3.4). Zusätzlich enthält der Target-Vektor eine Thymidinkinase-Kassette (tk), um die spätere Selektion der positiven Klone zu erleichtern. Im Anhang 7.8 ist die gesamte Sequenz des Target-Vektors mit allen relevanten Schnittstellen, verwendeten Primern, sowie die Position der Neomycin-Resistenz-Kassette und der Thymidinkinase-Kassette

dargestellt.

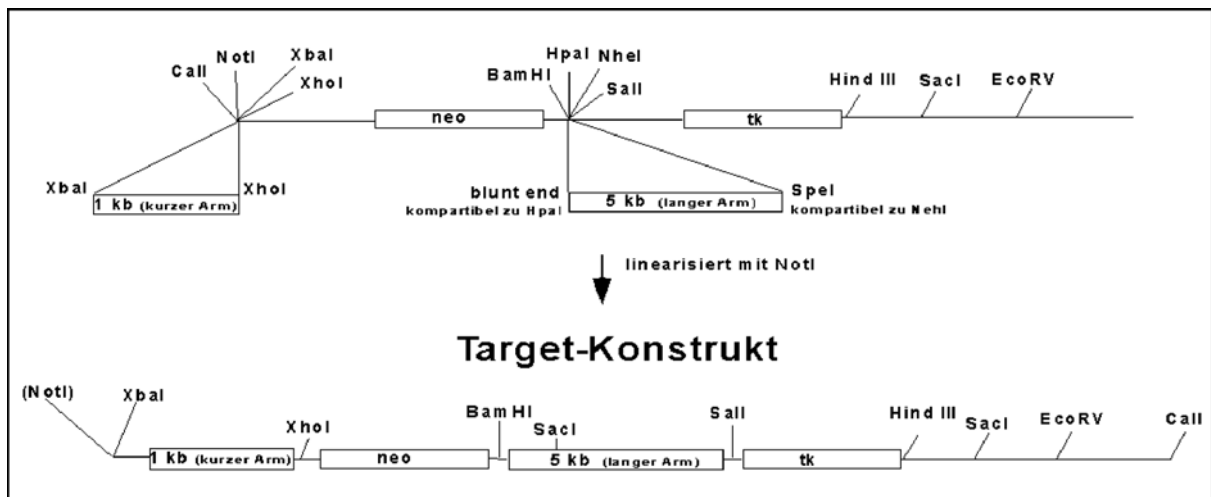


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des Target-Konstruktes.

Zusätzlich wurde noch ein zweites Target-Konstrukt, das als Kontrollvektor diente, entwickelt. Dieser Vektor besteht aus der 5'-Homologieregion, vor der Neomycin-Resistenz-Kassette, sowie 53 zusätzlichen Basenpaaren in Richtung 5'-Ende und enthält somit die Sequenz für den Vorwärts-Primer A. Dieser Primer liegt bereits im Genom, d. h. vor der 5'-Homologieregion des eigentlichen Target-Konstruktes.

1-27	pTV0-Vektor DNA
<u>ATCCGAGTTC CAGGAGTAGA CGTTTCGTCC TCTCTTGGGG CTGGCTCAGT AGA</u>	
Primer A fw→	
28-1026	(N-Terminus Desmoyokin)
1027-2170	(Neomyzyn-Resistenz-Kassette)
7449-9323	(Thymidinkinase Kassette)
9324-11992	pTV0-Vektor DNA

Abb. 3.5: Aufbau des zweiten Target-Konstruktes, das als Kontrollvektor dient. Der Vorwärts-Primer A ist in der Nukleotidsequenz unterstrichen. Die Zahlen geben die Basenpaar-Position im Target-Vektor an (siehe Anhang Abb. 7.8).



#### 3.1.3 Charakterisierung des Target-Konstruktes

Das Target-Konstrukt wurde mittels PCR auf die zwischenklonierten DNA-Fragmenten getestet (Abb. 3.6). Der kurze Arm wurde durch eine PCR mit den Primern: A<sub>1</sub> fw und B<sub>x</sub> rev, der lange Arm durch eine PCR mit den Primern: P7opt fw und P21 rev, nachgewiesen. Es ist eine 1005 bp-, sowie eine 5228 bp-große Bande entstanden. Die Banden entsprechen den Größen der Inserts.

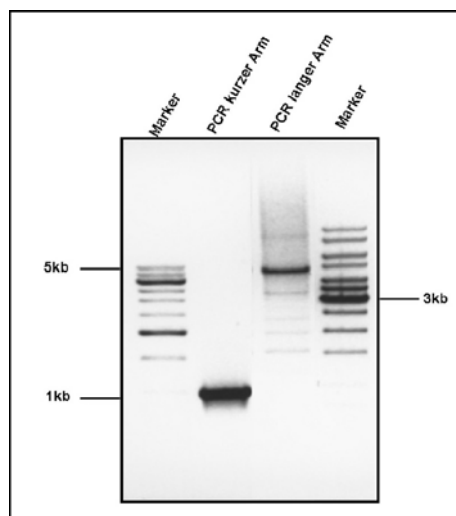


Abb. 3.6: Testung des Target-Konstruktes mittels PCR. Dargestellt sind die PCR-Produkte der 5'-Homologieregion (kurzer Arm, 1005 bp) und der 3'-Homologieregion (langer Arm, 5228 bp).

#### 3.1.4 Testung des Target-Konstruktes durch Restriktionshydrolyse

Für die Restriktionshydrolyse wurden die Restriktions-Endonukleasen *SacI* und *NotI* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) verwendet. Es wurden die pTV0-Vektoren: ohne Insert, mit dem Insert A<sub>1</sub>B<sub>x</sub> (1005 bp) und mit beiden Inserts (1005 bp und 5228 bp), durch *SacI* geschnitten. Ohne Insert wird eine Einzelbande mit der Größe des Vektors (5729 bp) erhalten. Der Vektor mit dem 1005 bp-großem Insert (kurzer Arm), stellt sich als Einzelbande mit einer Größe von 6734 bp dar. Beim pTV0-Vektor mit beiden Inserts können zwei Banden identifiziert werden, da nicht nur der Vektor,

sondern auch die 3'-Homologieregion (langer Arm, ca. 5228 bp) eine *SacI*-Schnittstelle enthält. Die zu erwartenden Größen liegen bei 5536 bp und 6456 bp. Durch die Restriktionshydrolyse mit *SacI* konnte auch die Orientierung des Inserts geprüft werden. Bei falschem Einbau werden zwei Banden mit den Größen: 1393 bp und 10599 bp sichtbar. Abschließend wurde noch das Target-Konstrukt mit *NotI* linearisiert, um die volle Größe des Konstruktes (11992 bp) zu zeigen.

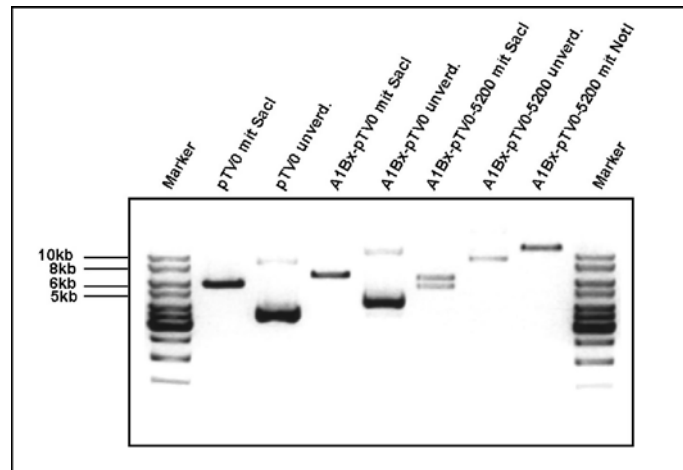


Abb. 3.7: Charakterisierung des Target-Konstruktes durch Restriktionshydrolyse

#### 3.1.5 ES-Zellen-Screening

Für die Erzeugung von ahnakdefizienten Zellen wurde die Technik der homologen Rekombination genutzt, die es erlaubt, gezielte Veränderungen in das Genom einzufügen. Das hier hergestellte Konstrukt wurde mit Hilfe der Elektroporation in ES-Zellen von männlichen 129sv-Mäusen transfiziert. Insgesamt wurden 6 Elektroporationen durchgeführt. Durch Selektion mit Antibiotikum-Resistenzen, sowie PCR-Analysen, konnten mehrere positive Klone (B9, D5, F10) identifiziert werden. Der Vorwärts-Primer für die PCR lag innerhalb des Genoms, der Rückwärts-Primer in der neo-Kassette. Bei erfolgreicher homologer Rekombination wurde ein DNA-Fragment mit einer Größe von 1414 bp amplifiziert.

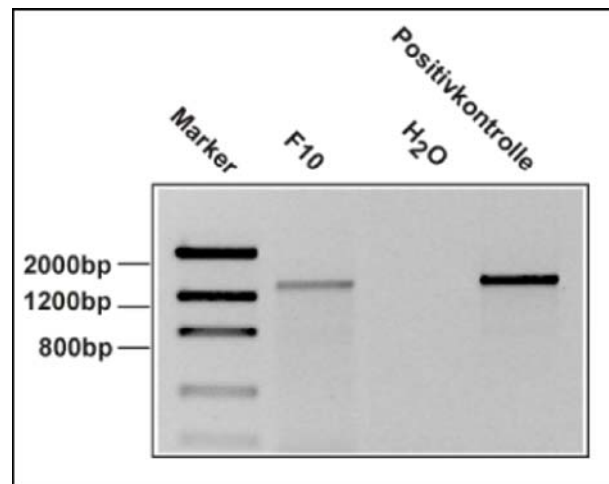


Abb. 3.8: PCR-Analyse der ES-Zell-Klone. Diese PCR wurde speziell für das Auffinden von Klonen mit homologer Rekombination entwickelt. Es wurden insgesamt drei positive Klone: B9, D5 und F10, aus 120 getesteten Klonen, identifiziert. Hier ist exemplarisch der Klon F10 dargestellt. Als Positivkontrolle diente das zweite Target-Konstrukt. Negativkontrolle war H<sub>2</sub>O.

#### 3.1.6 Proliferation der ES-Zellen

Die Proliferation der positiv homolog rekombinierten ES-Zellen (D5) wurde mit der Proliferation von normalen ES-Zellen verglichen. Abb. 3.9 zeigt den Zuwachs der Zellen in % am 2. und 4. Tag nach der Aussaat. Am Tag 0 wurde die eingesäte Zellzahl gleich 100% gesetzt. Für die Tage 2 und 4 wurde die Gesamtzellzahl in % bezüglich Tag 0 errechnet. Für Tag 2 ergab sich ein Zuwachs von  $755,4 \pm 126,7\%$  Zellen für normale ES-Zellen und  $640,7 \pm 87,5\%$  Zellen für die positiv-homolog-rekombinierten ES-Zellen. Für Tag 4 ergab sich ein Zuwachs von  $2394,7 \pm 623,3\%$  Zellen für normale ES-Zellen und  $1515 \pm 288\%$  Zellen für die positiv homolog rekombinierten ES-Zellen. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen positiv homolog rekombinierten und normalen ES-Zellen zu messen.

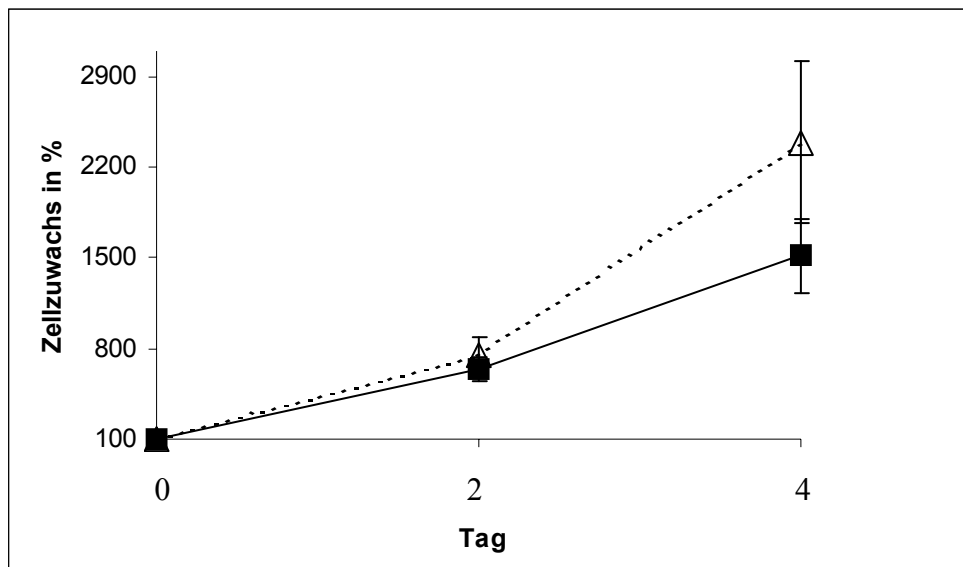


Abb. 3.9: Zellzuwachs der Wildtyp-ES-Zellen (offene Dreiecke) im Vergleich zu den Ahnak-Knock-Out-ES-Zellen (geschlossene Quadrate).

Um zu zeigen, dass Ahnak-defiziente ES-Zellen eine geringere Ahnak-Expression aufweisen, als die normalen ES-Zellen, wurden normale ES-Zellen (ES +/+), Ahnak-defiziente ES-Zellen (ES -/-) und Feederzellen zur Proteingewinnung verwendet. Da die ES-Zellen auf einem Feederzell-Monolayer wachsen, wurden auch diese Zellen in der Analyse berücksichtigt. Es wurde die SDS-extrahierte Gesamteinfraktion (2,5 µg) aus den Zellen aufgetragen (Abb. 3.10), dann die optische Dichte der einzelnen Banden gemessen und miteinander verglichen. Die optische Dichte der Feederzellen wurde von beiden ES-Zell-Typen (Wildtyp und Ahnak-defizient) abgezogen. Die Ahnak-defizienten ES-Zellen haben eine 1/3 geringere optische Dichte, als die normalen ES-Zellen. Woraus geschlossen werden kann, dass in den Ahnak-defizienten ES-Zellen weniger Ahnak exprimiert wird.

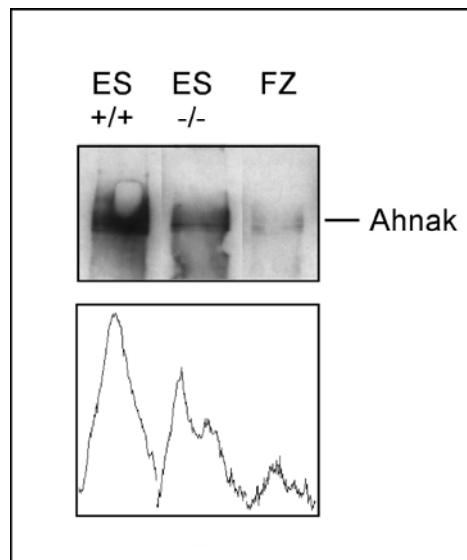


Abb. 3.10: Oben: Western-Blot-Analyse des Ahnak-Proteins mit einem spezifischen Anti-Ahnak-Antikörper (head). Nachgewiesen wurde die Expression von Ahnak in normalen ES-Zellen (ES +/+), in Ahnak-defizienten ES-Zellen (ES -/-), sowie in Feederzellen (FZ). Für die SDS-Gelelektrophorese wurden jeweils 2,5 µg der Gesamtproteinfraktion aufgetragen. Es handelt sich hierbei um ein 6,5%iges SDS-Gel. Unten: Density-Scan der darüberliegenden Western-Blot-Banden.

### 3.1.7 Phänotypisierung der Ahnak-Knock-Out-Mäuse

Die homozygoten Ahnak-Knock-Out-Mäuse wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. Kouno (Kouno, 2004) zur Verfügung gestellt. Western-Blot-Analysen von Herzpräparaten (Abb. 3.11) der Ahnak-Knock-Out-Mäuse zeigen, dass kein Ahnak-Protein detektiert wird.

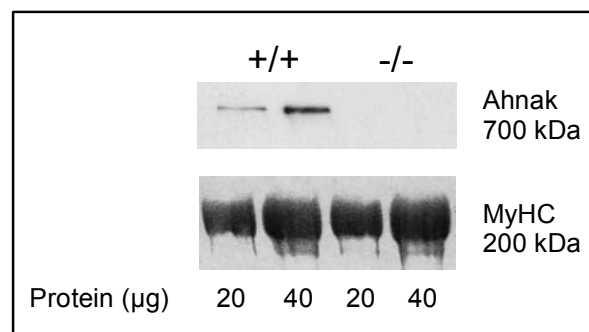


Abb. 3.11: Exemplarische Western-Blot-Analyse (oben) und Ponceau-Färbung (unten) des Ahnak-Proteins mit einem Sequenz-spezifischen Ahnak-Antikörper, der gegen die Kopfregion des Moleküls gerichtet ist (head). Nachgewiesen wurde die Expression von Ahnak im Wildtyp- (+/+), sowie die Deletion im Ahnak-Knock-Out-Mauserherzen (-/-). Es handelt sich hierbei um

ein 6,5%iges SDS-Gel. Für die SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse wurden jeweils 20 µg und 40 µg der Gesamtproteinfraktion aufgetragen. Die Ponceau-Färbung zeigt gleiche Proteinmengen der schweren Kette des Myosins (MyHC) in beiden Herzen und dient als Ladungskontrolle.

#### 3.1.8 Morphologische Untersuchungen adulter Kardiomyozyten von Ahnak-Wildtyp- und Ahnak-Knock-Out-Mäusen

Für die morphologischen Untersuchungen wurden adulte Kardiomyozyten aus männlichen Ahnak-Knock-Out- bzw. Ahnak-Wildtyp-Mausherzen (3 Monate alt) durch Kollagenasebehandlung gewonnen. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen die typische quergestreifte Struktur der adulten Herzzellen, sowie deutliche morphologische Unterschiede (Abb. 3.12). Insgesamt wurden für die Versuche 275 Zellen von Ahnak-Knock-Out- und 187 Zellen von Ahnak-Wildtyp-Tieren vermessen. Die, unter konstanten Bedingungen gesammelten, Einzeldaten wurden als Mittelwerte zusammengefasst und mit  $\pm$  SEM angegeben.

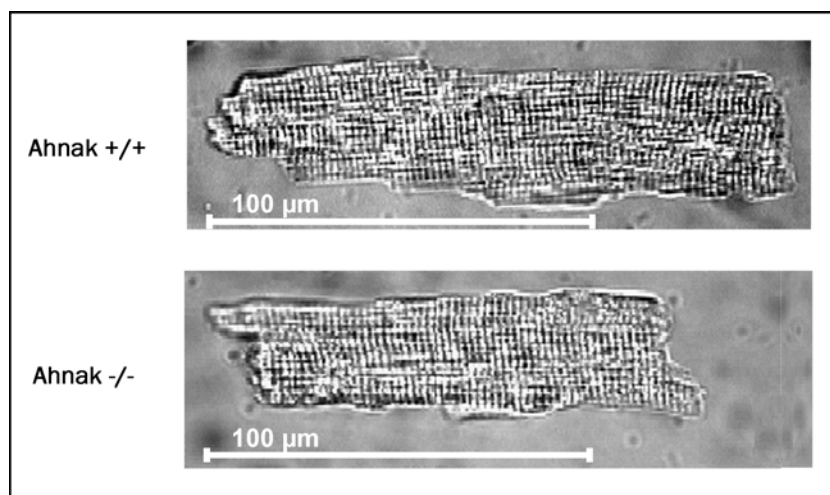


Abb. 3.12: Lichtmikroskopische Aufnahmen (40-fach vergrößert) von adulten intakten Maus-Kardiomyozyten (3 Monate alt); oben: Ahnak-Wildtyp, unten: Ahnak-Knock-Out.

Abbildung 3.13A zeigt die Zelldicke der Kardiomyozyten beim Ahnak-Wildtyp ( $29,59 \pm 0,43$  µm) und beim Ahnak-Knock-Out ( $30,26 \pm 0,37$  µm), die sich bei beiden Stämmen nicht signifikant unterscheidet. Die Sarkomerlänge

unterscheidet sich zwischen Wildtyp ( $1,89 \pm 0,0010 \mu\text{m}$ ) und Knock-Out ( $1,89 \pm 0,0007 \mu\text{m}$ ) ebenfalls nicht signifikant (Abb. 3.13B). Allerdings ist die Gesamtzelllänge adulter Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten ( $133,06 \pm 1,18 \mu\text{m}$ ) um 13,6% signifikant kürzer als vergleichbare Ahnak-Wildtyp-Kardiomyozyten ( $154,10 \pm 2,16 \mu\text{m}$ ) (Abb. 3.13C).

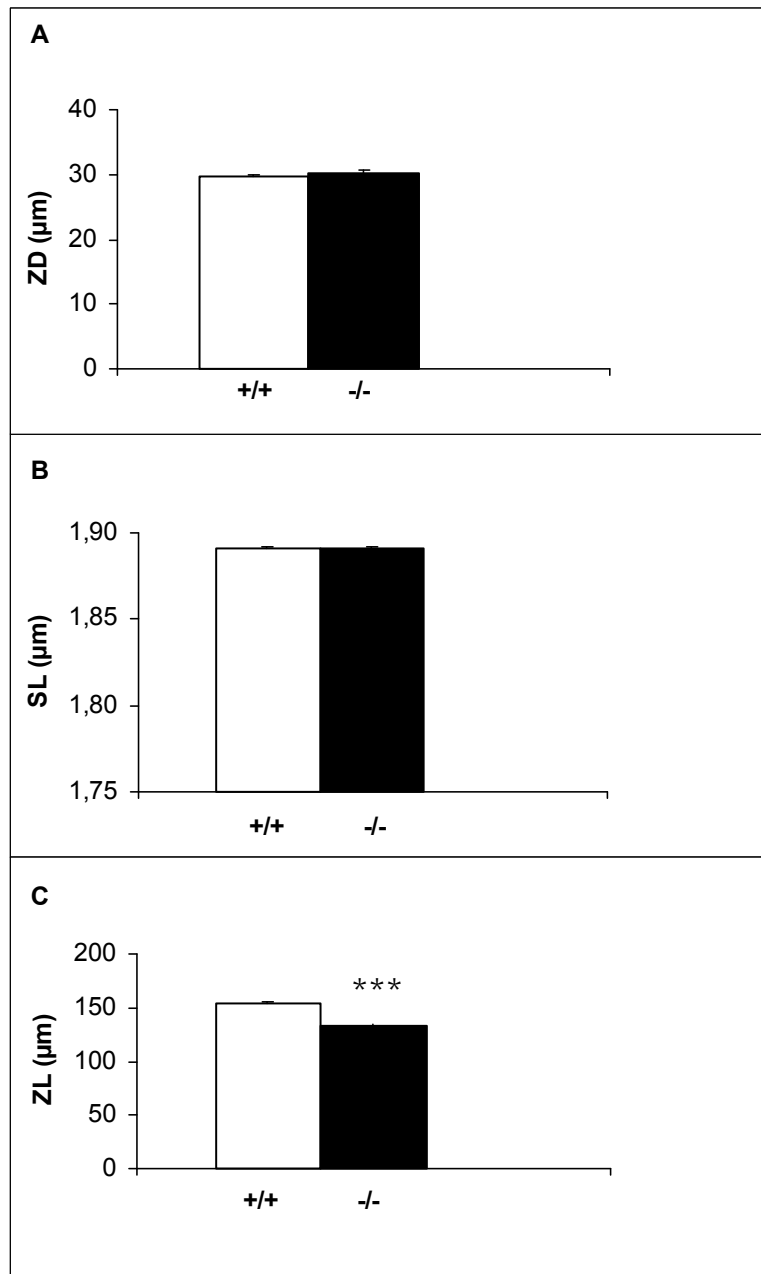


Abb. 3.13: Morphologische Unterschiede zwischen Kardiomyozyten aus Ahnak-Wildtyp- (weiß) und Ahnak-Knock-Out-Mäusen (schwarz). A) Zelldicke (ZD) B) Sarkomerlänge (SL) C) Gesamtzelllänge(ZL). Insgesamt wurden 187 Wildtyp- und 275 Knock-Out-Kardiomyozyten-Zellen vermessen. Einzeldaten wurden als Mittelwerte zusammengefasst und  $\pm$  SEM angegeben; \*\*\*P<0.001.

#### **3.1.9 Einzelzell-Messungen adulter Kardiomyozyten vom Ahnak-Wildtyp und Ahnak-Knock-Out**

Für die Einzelzell-Messungen wurden adulte Kardiomyozyten aus Ahnak-Knock-Out- bzw. Ahnak-Wildtyp-Mausherzen (3 und 6 Monate alt) gewonnen. Es wurden nur isolierte Kardiomyozyten verwendet, deren Sarkomerlänge nicht kleiner als 1,7  $\mu\text{m}$  war. Bei den Kardiomyozyten wurden gleichzeitig die Parameter der Zellverkürzung (prozentuale Verkürzungsamplitude, maximale Verkürzungs- und maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit) und die Parameter des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten (Fura-2-Signal), (diastolischer und systolischer Kalziumwert, Amplitude, max. Geschw. der Fluoreszenzentwicklung und des Fluoreszenzabfalls)) in einem Ionoptix Kontraktions- und Fluoreszenzsystem (Ionoptix, Milton, MA, USA) aufgezeichnet.

In Abbildung 3.14 wird eine typische Aufzeichnung eines Versuchsablaufes mit der Video-edge Technik im Ionoptix Kontraktions- und Fluoreszenzsystem gezeigt. Eine Einzelzelle wurde erst mit bipolaren Pulsen von 1 Hz, für die Dauer von 5 ms, im elektrischen Feld stimuliert. Nach Einstellen einer gleichmäßigen Kontraktionrate wurde die Zelle durch Zugabe von 10 nM (3 Monate alte Kardiomyozyte) bzw. 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin (6 Monate alte Kardiomyozyte)  $\beta$ -adrenerg stimuliert.



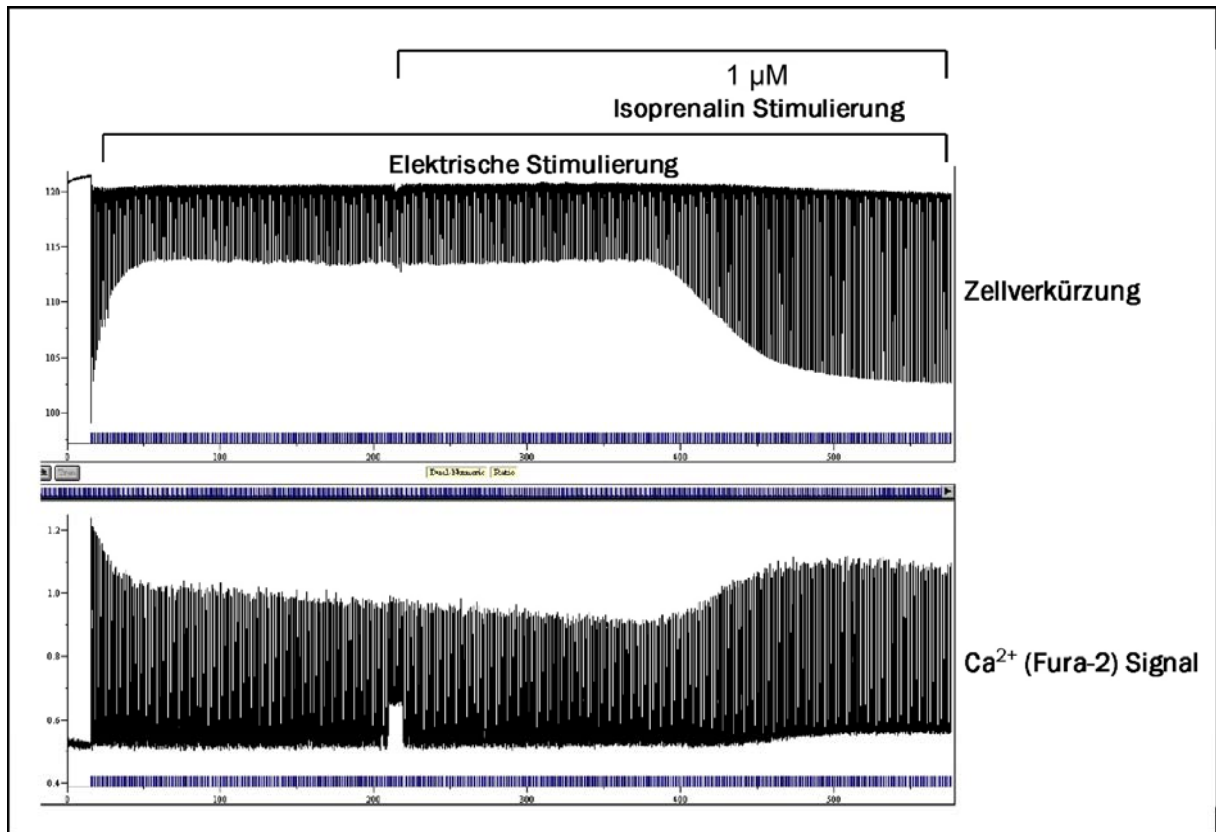


Abb. 3.14: Aufzeichnung eines Versuchsablaufs im Ionoptix Kontraktions- und Fluoreszenzsystem. Gezeigt sind der zeitliche Verlauf der Zellverkürzung (oben) und das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -(Fura-2)-Signal (R340/380) (unten) einer Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyte unter elektrischer Stimulierung von 1Hz und nach Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin. Die Antwort auf die  $\beta$ -adrenerge Stimulierung durch Isoprenalin erfolgt mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 3-5 min.

Die Parameter des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transients zeigen, dass 6 Monate alte homozygote Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten einen komplex veränderten kardialen Phänotyp besitzen. Die diastolische, sowie systolische, intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist bei den Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten signifikant erhöht (Abb. 3.15 A, B). Ebenso wie die signifikant gesteigerten Geschwindigkeiten des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs und -Abfalls unter basalen, nichtstimulierten Bedingungen (Abb. 3.15 C,D). Bereits bei 3 Monate alten Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten konnte ein signifikant erhöhter diastolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, im Vergleich zu Ahnak-Wildtyp-Kardiomyozyten, beobachtet werden. Allerdings galt dies nicht für den systolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel (Daten nicht gezeigt).

Nach Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin (Iso) zeigt sich, die, wie nach  $\beta$ -adrenerger Stimulierung, zu erwartende signifikante Erhöhung der Parameter des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transients bei den Ahnak-Wildtyp-Kardiomyozyten. Bei den Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten ist die Stimulierbarkeit mit Isoprenalin dagegen abgeschwächt. Die ermittelten Daten des Fura-2-Fluoreszenzsignals sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

	Ahnak +/+	Ahnak -/-	Ahnak +/+ (Iso 1 $\mu\text{M}$ )	Ahnak -/- (Iso 1 $\mu\text{M}$ )
<b>Fura-2-Signal während Diastole</b>	1,25 $\pm$ 0,04	1,42 $\pm$ 0,06*	1,32 $\pm$ 0,05	1,48, $\pm$ 0,07
<b>Fura-2-Signal während Systole</b>	1,58 $\pm$ 0,06	1,92 $\pm$ 0,07***	1,79 $\pm$ 0,07 <sup>+</sup>	2,09 $\pm$ 0,09**
<b>+dR/dt (1/s)</b>	8,98 $\pm$ 0,65	13,77 $\pm$ 1,44**	12,26 $\pm$ 0,96 <sup>++</sup>	16,87 $\pm$ 1,57*
<b>-dR/dt (1/s)</b>	-3,10 $\pm$ 0,21	-4,60 $\pm$ 0,54**	-5,65 $\pm$ 0,47 <sup>+++</sup>	-7,33 $\pm$ 0,72 <sup>#</sup>
<b>Amplitude</b>	0,33 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,05**	0,47 $\pm$ 0,04 <sup>++</sup>	0,62 $\pm$ 0,06*
<b>Anzahl (N)</b>	17	14	17	14

Tab. 3.1:  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient (Fura-2-Signal, R340/380). 6 Monate alte Ahnak-Wildtyp- und Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten im Vergleich mit und ohne Isoprenalin-Zugabe. R ist die Ratio bei 340/380 nm; +dR/dt ist die Geschwindigkeit der Fluoreszenzentwicklung (1/s) bzw. des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs; -dR/dt ist die Geschwindigkeit des Fluoreszenzabfalls (1/s) bzw. des  $\text{Ca}^{2+}$ -Abfalls. Die Amplitude ergibt sich aus der Differenz von Systole und Diastole. Die Mittelwerte sind  $\pm$  SEM angegeben. \* ~ KO-Ahnak vs. Ahnak-Wildtyp; <sup>+</sup> ~ Ahnak-Wildtyp vor Iso-Stimulierung vs. Ahnak-Wildtyp nach Iso-Stimulierung; <sup>#</sup> ~ Ahnak-Knock-Out vor Iso-Stimulierung vs. Ahnak-Knock-Out nach Iso-Stimulierung; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Die Abbildung 3.15 (A-D) zeigt die Parameter des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transients (Fura-2-Signal) von 6 Monate alten Ahnak-Knock-Out- und Ahnak-Wildtyp-Kardiomyozyten vor bzw. nach 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin-Stimulierung.

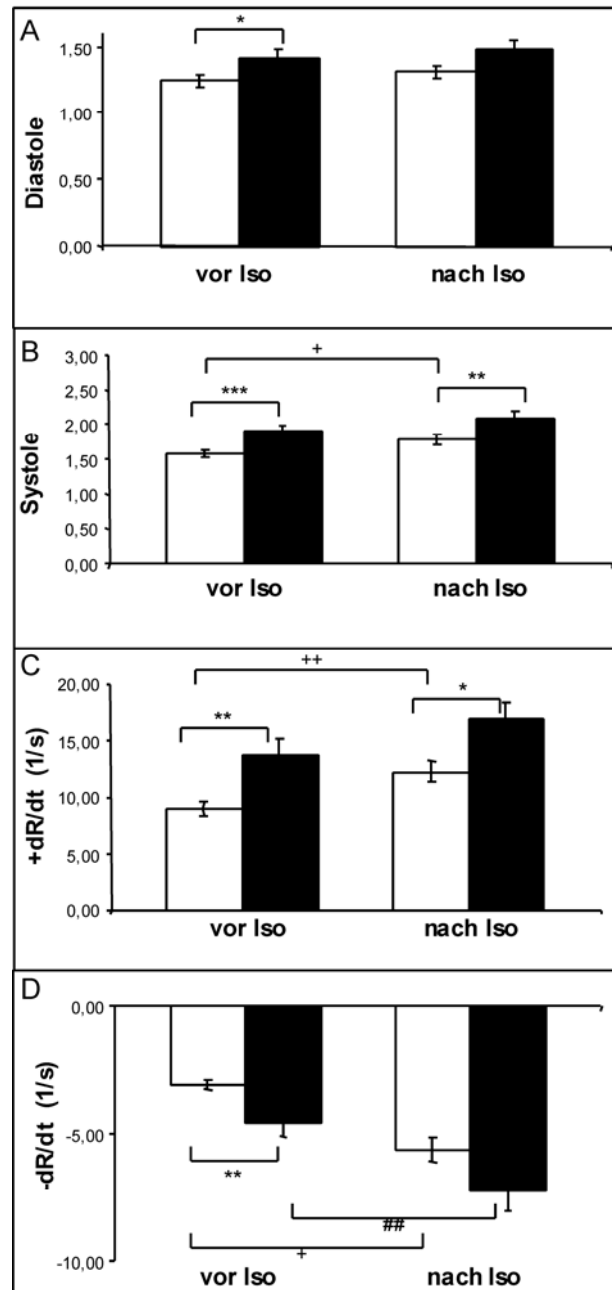


Abb. 3.15: Veränderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Kardiomyozyten während einer Kontraktion von 6 Monate alten Kardiomyozyten. Das zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$  wird als Ratio der Fura-2-Fluoreszenz bei 340/380 nm vor und nach 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalinzugabe (Iso) gemessen. A) zeigt das basale Fura-2-Signal während der Diastole, B) das maximale Fura-2-Signal während der Systole. C)  $+dR/dt$  ist die Geschwindigkeit der Fluoreszenzentwicklung (1/s) bzw. des  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs während Verkürzung D)  $-dR/dt$  ist die Geschwindigkeit des Fluoreszenzabfalls (1/s) bzw. des  $\text{Ca}^{2+}$ -Abfalls während der Erschlaffung. Ahnak-Wildtyp (offene Balken, n=17); Ahnak-Knock-Out (schwarze Balken, n= 14). \* ~ KO-Ahnak vs. Ahnak-Wildtyp; + ~ Ahnak-Wildtyp vor Iso-Stimulierung vs. Ahnak-Wildtyp nach Iso-Stimulierung; # ~ Ahnak-Knock-Out vor Iso-Stimulierung vs. Ahnak-Knock-Out nach Iso-Stimulierung; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Die Messungen der Zellverkürzung der 6 Monate alten Ahnak-Wildtyp- und homozygoten Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten sind tabellarisch aufgeführt (Tabelle 3.2). Die Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten haben eine signifikant höhere, basale Verkürzungsamplitude als die Ahnak-Wildtypen. Die maximale Verkürzungs- und Erschlaffungsgeschwindigkeit ist bei den Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten ebenfalls tendenziell erhöht. Dieser Effekt ist jedoch im Gegensatz zu den oben beschriebenen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nicht statistisch signifikant.

Nach Iso-Zugabe sind die kontraktilen Parameter (prozentuale Verkürzungsamplitude, maximale Verkürzungs- und maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit) beim Ahnak-Knock-Out und beim Ahnak-Wildtyp gegenüber den Basalwerten signifikant erhöht.

	Ahnak +/+	Ahnak -/-	Ahnak +/+ (Iso 1 $\mu\text{M}$ )	Ahnak -/- (Iso 1 $\mu\text{M}$ )
<b>Verkürzungsamplitude (%)</b>	1,94 $\pm$ 0,26	3,10 $\pm$ 0,49*	9,84 $\pm$ 0,66 <sup>+++</sup>	8,94 $\pm$ 1,05 <sup>###</sup>
<b>-dS/dt max. (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	-70,13 $\pm$ 8,56	-85,92 $\pm$ 13,20	-313,19 $\pm$ 23,47 <sup>+++</sup>	-234,89 $\pm$ 27,34 <sup>*/###</sup>
<b>+dS/dt max. (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	45,92 $\pm$ 6,28	59,61 $\pm$ 9,98	251,67 $\pm$ 19,58 <sup>+++</sup>	192,60 $\pm$ 24,73 <sup>###</sup>
<b>Anzahl (N)</b>	20	14	20	14

Tab. 3.2: Zellverkürzung. Ahnak-Wildtyp (+/+) und Ahnak-Knock-Out (-/-) im Vergleich mit und ohne 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalinzugabe. -dS/dt max., maximale Verkürzungsgeschwindigkeit; +dS/dt max., maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit. Die Mittelwerte sind  $\pm$  SEM angegeben. \* ~ KO-Ahnak vs. Ahnak-Wildtyp; + ~ Ahnak-Wildtyp vor Iso-Stimulierung vs. Ahnak-Wildtyp nach Iso-Stimulierung, # ~ Ahnak-Knock-Out vor Iso-Stimulierung vs. Ahnak-Knock-Out nach Iso-Stimulierung; \*P<0.05, \*\*\*P<0.001.

Die Abbildung 3.16 (A-C) zeigt die prozentuale Verkürzungsamplitude, die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit von Ahnak-Knock-Out- und

Ahnak-Wildtyp-Kardiomyozyten vor bzw. nach 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalin-Stimulierung. Die Kontraktionsgeschwindigkeit der Zellverkürzung ist negativ, da sich die Gesamtzelllänge verringert.

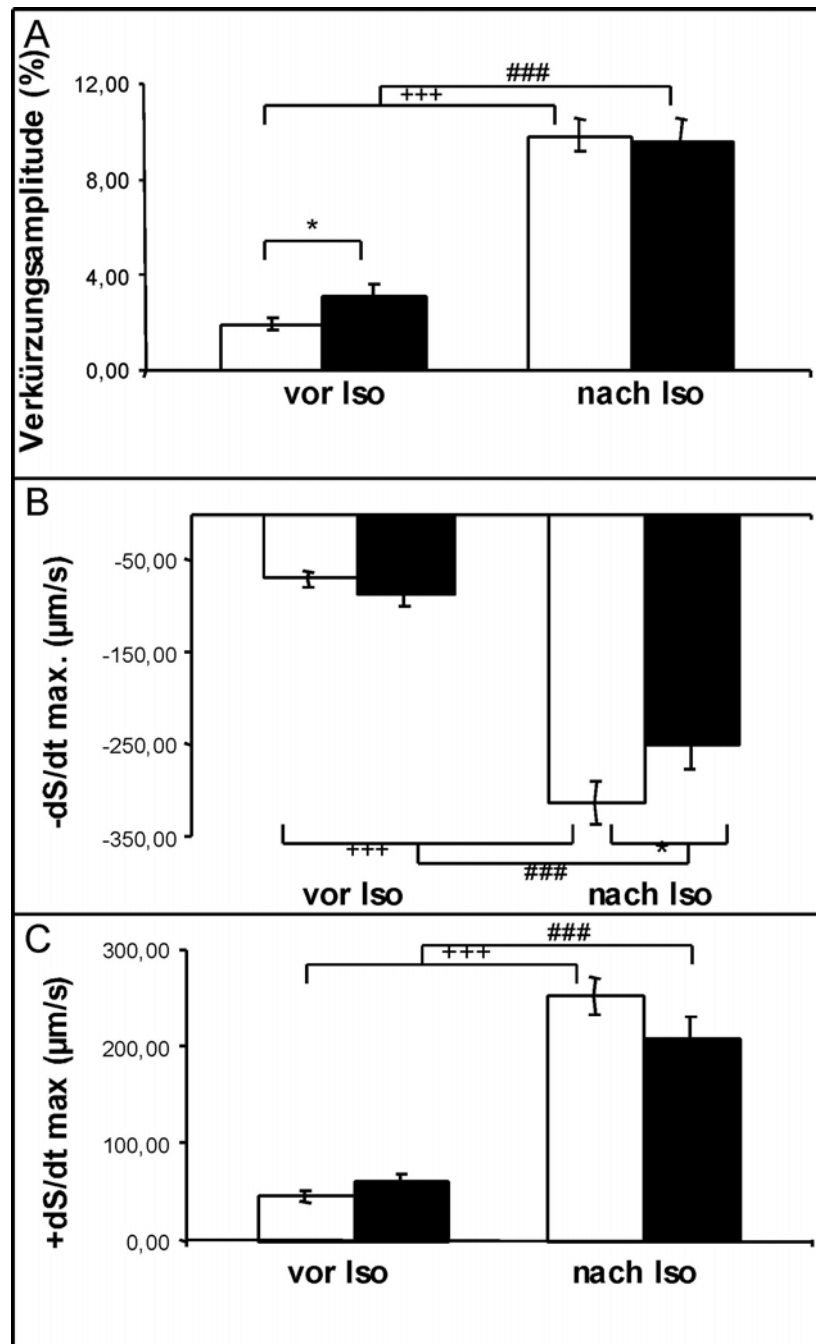


Abb. 3.16: Graphische Darstellung der Zellverkürzungsparameter von 6 Monate alten Ahnak-Wildtyp- und Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten vor und nach 1  $\mu\text{M}$  Isoprenalinzugabe (Iso). A) zeigt die prozentuale Verkürzungsamplitude (%). B) zeigt die maximale Verkürzungsgeschwindigkeit ( $-\text{dS}/\text{dt max.}$ ;  $\mu\text{m/s}$ ). C) zeigt die maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit ( $+\text{dS}/\text{dt max.}$ ;  $\mu\text{m/s}$ ). Wildtyp (offene Balken,  $n=20$ ); Ahnak-Knock-Out (schwarze Balken,  $n=14$ ). \* ~ KO-Ahnak vs. Ahnak-Wildtyp; + ~ Ahnak-Wildtyp vor Iso-Stimulierung vs. Ahnak-Wildtyp nach Iso-

Stimulierung; # ~ Ahnak-Knock-Out vor Iso-Stimulierung vs. Ahnak-Knock-Out nach Iso-Stimulierung; \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

Abbildung 3.17 (A,B) zeigt die Gesamtzellverkürzung in %, aufgetragen gegen die basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude von 3 Monate alten Ahnak-Wildtyp- und Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten. Die Wildtyp-Kardiomyozyten sind in diesem relativ jungem Alter  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver als Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten. Dies zeigt sich in der signifikant (\*\*\* $P < 0.001$ ) unterschiedlichen basalen Zellverkürzungamplitude von  $3,70 \pm 0,48\%$  der Wildtypen gegenüber den Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten mit  $2,04 \pm 0,21\%$ .

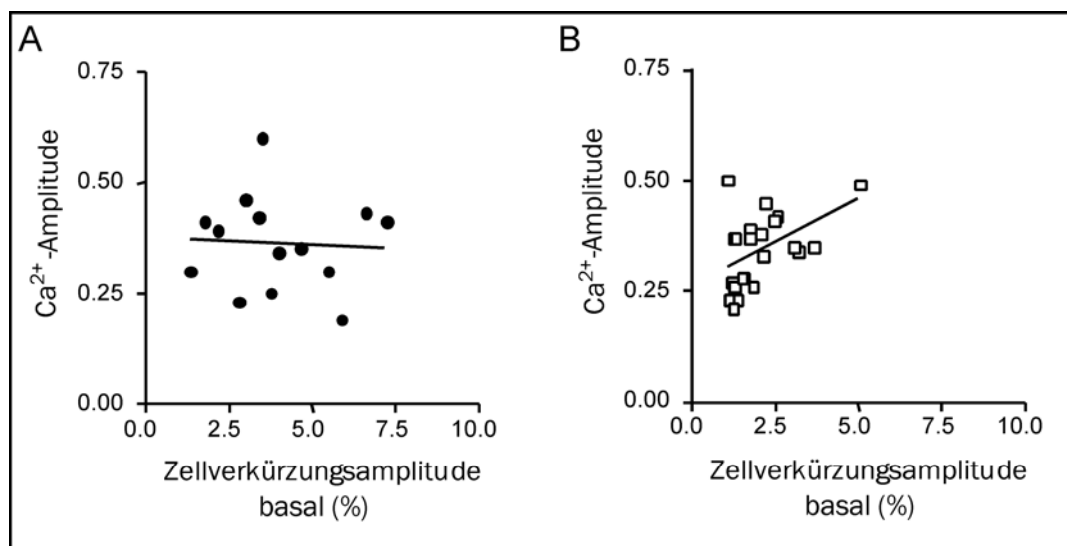


Abb. 3.17: Graphische Darstellung der basalen Zellverkürzungsamplitude in % gegen die basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Amplitude. A) Ahnak-Wildtyp-Kardiomyozyten (geschlossene Kreise, 3 Monate alt); B) Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten (offene Quadrate, 3 Monate alt).

Bei den 3 Monate alten Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten war auch keine signifikant verringerte  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit zu erkennen. Abbildung 3.18 zeigt die Gesamtzellverkürzung in %, abhängig von der prozentualen Iso-Stimulierung. Es ist für beide Zelltypen ein hyperbolischer Verlauf zu beobachten. Trotzdem die Ahnak-Knock-Out-Verkürzungsamplitude etwas geringer ist, sind die Werte der prozentualen Iso-Stimulierung der Wildtypen mit  $329,80 \pm 56,20\%$  nicht unterschiedlich signifikant gegenüber den Knock-Out-Kardiomyozyten mit  $450,20 \pm 43,99\%$ .

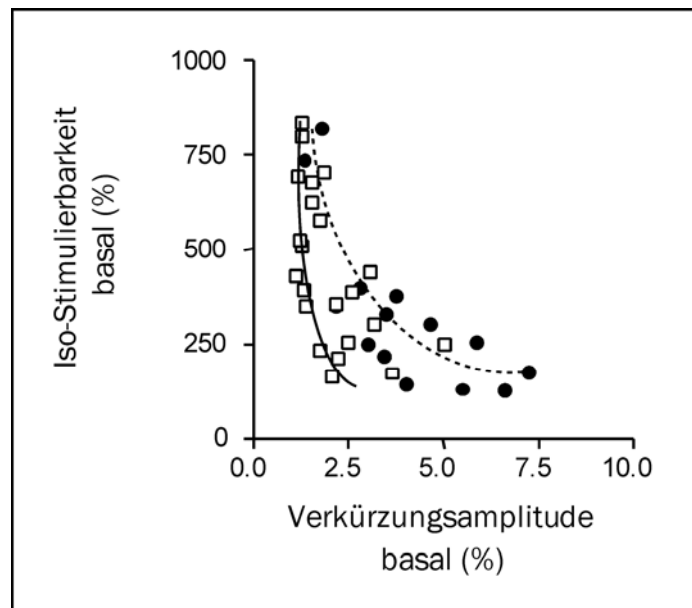


Abb. 3.18: Graphische Darstellung der Gesamtzellverkürzung in %, in Abhängigkeit zur prozentualen Iso-Stimulierung von 3 Monate alten Mauscardiomyozyten. Ahnak-Wildtyp (geschlossene Punkte, gestrichelte Hyperbel); Ahnak-Knock-Out (offene Quadrate, durchgezogene Hyperbel)

Bei 6 Monate alten Ahnak-Wildtyp und Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten ist der Phänotyp richtig ausgeprägt. Bei der Analyse der prozentualen Iso-Stimulierbarkeit der Zellverkürzungsparameter konnte eine signifikante Verringerung der  $\beta$ -adrenergen Stimulierung bis zu 45% beobachten werden. Die abgeschwächte Isoprenalin-Antwort zeigt sich deutlich in den Werten der Verkürzungsamplitude ( $672,60 \pm 88,48\%$  Ahnak-Wildtyp und  $376,40 \pm 57,09\%$  Ahnak-Knock-Out), der Verkürzungsgeschwindigkeit ( $553,00 \pm 65,50\%$  Ahnak-Wildtyp und  $338,90 \pm 43,45\%$  Ahnak-Knock-Out) und der Erschlaffungsgeschwindigkeit ( $748,30 \pm 103,7\%$  Ahnak-Wildtyp und  $421,30 \pm 66,22\%$  Ahnak-Knock-Out).

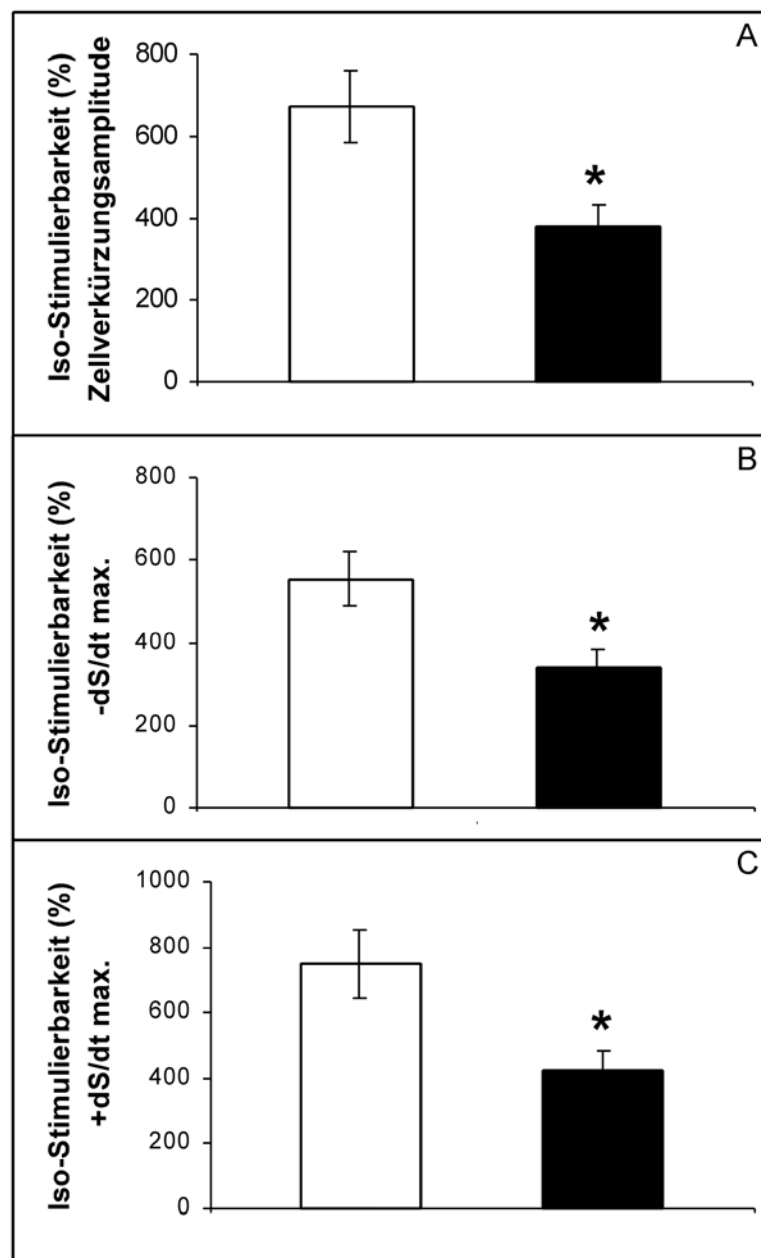


Abb. 3.19: Prozentuale Iso-Stimulierung der Ahnak-Wildtyp- (offene Balken, n=20) und Ahnak-Knock-Out-Mäuse (schwarze Balken, n=14) im Vergleich. A zeigt die pozentuale Stimulierung der Zellverkürzungsamplitude (%), B die maximale Verkürzungsgeschwindigkeit (-dS/dt max.; %) und C zeigt die maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit (+dS/dt max.; %). \*P<0.05



### 3.1.10 Vergleich der aktiven und passiven Kontraktionseigenschaften von Ahnak-Wildtyp- und Ahnak-Knock-Out-Herzen

Es wurden jeweils 4 Ahnak-Wildtyp- und 4 Ahnak-Knock-Out-Mäuse (Weibchen, 5 Monate alt), für die Analyse der aktiven und passiven Kontraktionseigenschaften verwendet (2.3.10). Die Herzen wurde als isoliert perfundierte Organe im sogenannten „Working-Heart-Modus“ analysiert. Tabelle 3.3 zeigt die morphologischen Daten.

	Körpergewicht (KG) in g	Herzgewicht (HG) in g	HG/KG	Anzahl (N)
<b>Ahnak +/+</b>	24,47 ± 1,07	0,15 ± 0,009	6,12 ± 0,14	4
<b>Ahnak -/-</b>	24,36 ± 0,27	0,17 ± 0,007*	6,97 ± 0,2***	4

Tab. 3.3: Morphologische Daten von Ahnak-Wildtyp- und Ahnak-Knock-Out-Mäusen. Mittelwerte  $\pm$  SD; \* ~ KO-Ahnak vs. Ahnak-Wildtyp; \*\*\*P<0.001.

Die perfundierten Herzen wurden elektrisch stimuliert, so dass eine konstante Herzrate von  $385,96 \pm 12,25$  bpm erzielt wurde und die Herzen damit untereinander vergleichbar waren. Abbildung 3.20 A zeigt den systolisch intrakardialen Druck beim Wildtyp und beim Ahnak-Knock-Out. Der Ahnak-Knock-Out hat einen systolisch intrakardialen Druck von  $69,49 \pm 1,74$  mmHg und ist signifikant höher als der Ahnak-Wildtyp mit einem systolisch intrakardialen Druck von  $53,76 \pm 8,1$  mmHg. Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit ist beim Ahnak-Knock-Out tendenziell erhöht aber nicht statistisch signifikant gegenüber dem Ahnak-Wildtyp. Die Ahnak-Knock-Out-Herzen besitzen eine Kontraktionsgeschwindigkeit von  $2502,06 \pm 255,46$  mmHg/s), die Ahnak-Wildtyp-Herzen eine Kontraktionsgeschwindigkeit von  $2171,18 \pm 509,19$  mmHg/s (Abbildung 3.20 B). Die Relaxationsgeschwindigkeit (Abbildung 3.20 C) ist bei den Ahnak-Knock-Out-Herzen ebenfalls tendenziell höher ( $-2044,87 \pm 277,17$  mmHg/s) als bei den Ahnak-Wildtyp-Herzen ( $-1597,15 \pm 476,46$  mmHg/s).

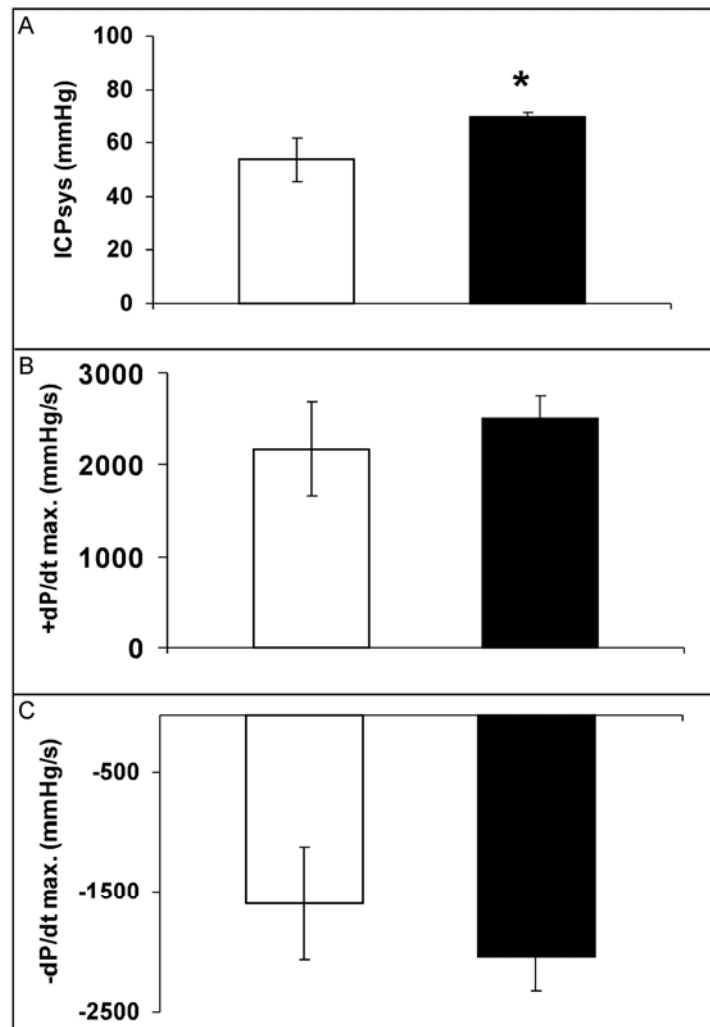


Abb. 3.20: Aktive Kontraktionseigenschaften der Ahnak-Wildtyp- (offene Balken,  $n=4$ ) und Ahnak-Knock-Out-Mäuse (schwarze Balken,  $n=4$ ) im Vergleich. A zeigt den systolischen intrakardialen Druck (ICPsys, mmHg), B die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (+dP/dt max., mmHg/s) und C die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (-dP/dt max., mmHg/s). Alle Untersuchungen wurden bei einer konstanten Herzfrequenz von  $385,96 \pm 12,25$  bpm durchgeführt. Insgesamt wurden jeweils 4 Tiere im Alter von 5 Monaten getestet. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

In Abbildung 3.21 ist die unterschiedliche Iso-Stimulierbarkeit in % für den systolisch intrakardialen Druck und für die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit von jeweils 4 Ahnak-Wildtyp- und Ahnak-Knock-Out-Herzen dargestellt. Insgesamt war bei den Ahnak-Knock-Out-Herzen die Stimulierbarkeit mit Isoprenalin deutlich reduziert. Prozentual steigt der systolisch intrakardiale Druck (Abb. 3.21 A) bei Iso-Stimulierung um  $180,76 \pm 19,62\%$  bei den Wildtypen signifikant stärker an, als bei den Ahnak-Knock-

Out-Herzen ( $119,45 \pm 6,24\%$ ). Auch die prozentuale Erhöhung der Kontraktionsgeschwindigkeit (Abb. 3.21 B) ist bei den Ahnak-Wildtypen ( $318,00 \pm 65,62\%$ ) signifikant größer als beim Ahnak-Knock-Out mit  $218,34 \pm 35,53\%$ . Die Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 3.21 C) wird ebenfalls bei den Ahnak-Wildtypen ( $298,56 \pm 65,18\%$ ) durch Iso-Stimulierung stärker erhöht, als beim Ahnak-Knock-Out ( $177,59 \pm 48,19\%$ ).

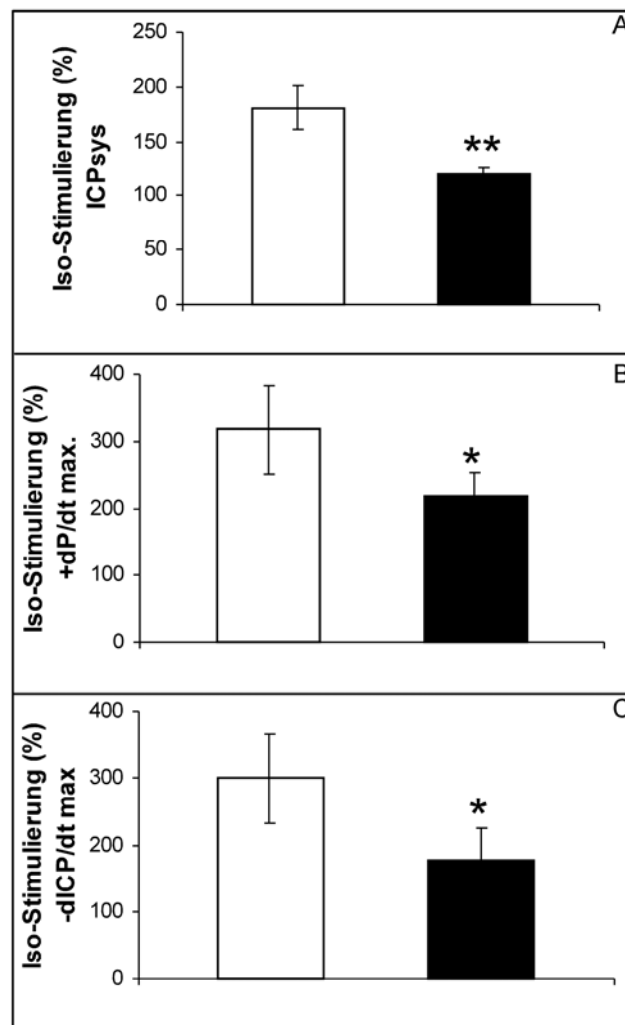


Abb. 3.21: Prozentuale Iso-Stimulierung der Ahnak-Wildtyp- (offene Balken, n=4) und Ahnak-Knock-Out-Mäuse (schwarze Balken, n=4) im Vergleich. A zeigt die prozentuale Stimulierung des systolisch intrakardialen Drucks (ICPsys, %), B die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (+dP/dt max., %) und C die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (-dP/dt max., %). Die Daten wurden beim Erhalt eines Plateaus nach Zugabe von 1  $\mu$ M Isoprenalin ermittelt. Insgesamt wurden jeweils 4 Tiere im Alter von 5 Monaten getestet; \*P<0.05, \*\*P<0.01.

Bei niedriger Vorlast unterscheiden sich die Herzen der Ahnak-Wildtypen und Ahnak-Knock-Out-Mäuse in den passiven Kontraktionseigenschaften nicht.

Abb. 3.22 zeigt einen repräsentativen Kurvenverlauf des enddiastolischen Druck-Volumen-Verhältnis, bei stufenweiser Erhöhung des diastolischen Volumen pro Herzschlag, von ca. 10  $\mu$ l auf ca. 20  $\mu$ l. Bei einem Volumen von ca. 10  $\mu$ l entwickeln die Ahnak-Wildtyp-Herzen keinen signifikant unterschiedlichen enddiastolischen Druck ( $10,54 \pm 0,21$  mmHg) im Vergleich zum Ahnak-Knock-Out-Herzen ( $11,06 \pm 0,23$  mmHg). Wird aber das Volumen pro Herzschlag auf ca. 20  $\mu$ l erhöht, unterscheiden sich die Ahnak-Wildtyp-Herzen mit einem enddiastolischen Druck von  $17,85 \pm 2,37$   $\mu$ l signifikant (\* $P < 0.05$ ) von den Herzen der Ahnak-Knock-Out-Maus ( $13,29 \pm 0,96$  mmHg).

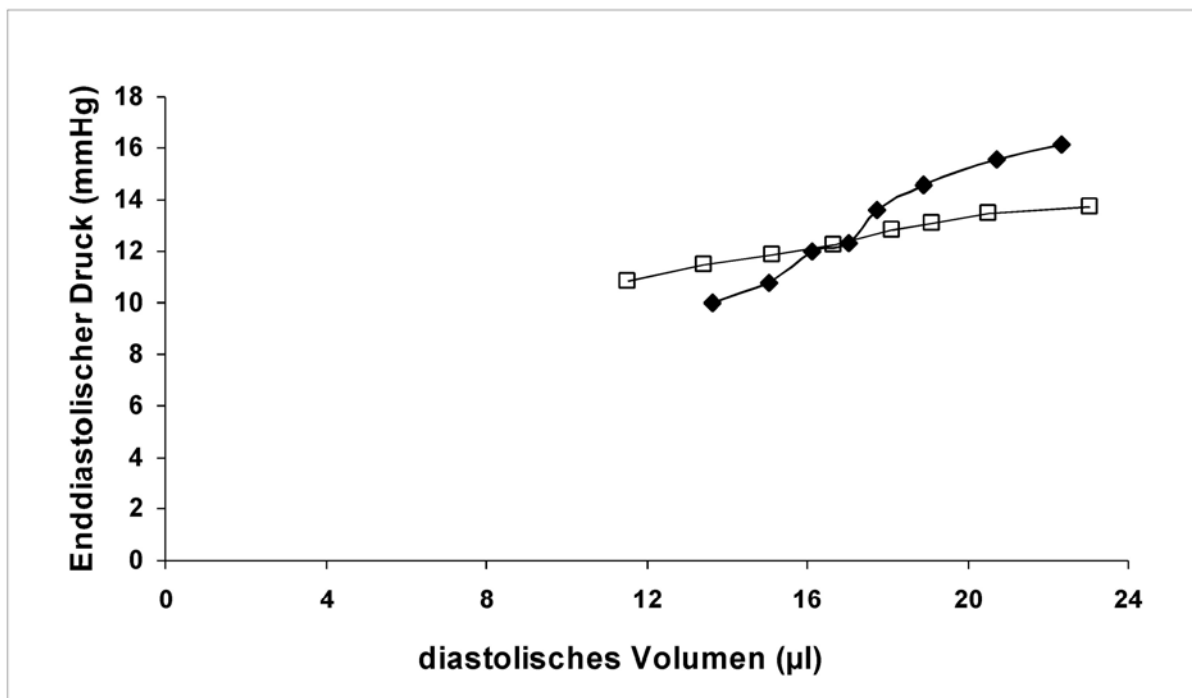


Abb. 3.22: Enddiastolisches-Druck-Volumen-Verhältnis. Änderung des enddiastolischen Drucks bei stufenweiser Erhöhung des Volumens ( $\mu$ l) pro Herzschlag in Ahnak-Wildtyp- (geschlossene Quadrate) und Ahnak-Knock-Out-Herzen (offene Quadrate).

## 3.2 Identifizierung natürlich vorkommender Ahnak-Mutationen

Die  $\beta 2$ -Untereinheit des kardialen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals beeinflusst nicht nur die funktionellen und strukturellen Eigenschaften (Hofmann, 1999) kardialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, sie ist darüber hinaus mit dem hochmolekularen Protein Ahnak assoziiert (Haase, 1999). In Kooperation mit Frau Prof. Regitz-Zagrosek (Deutsches Herzzentrum, Berlin) wurde bei Patienten mit Kardiomyopathien (hypertrophe und dilatative Kardiomyopathien) ein Mutations-Screening-Programm begonnen. Mit dem Single-Strand-Conformational-Polymorphism-Analyseverfahren (SSCP) wurde die äußere C-terminale Region des Ahnak-Gens (ca. 1300 bp) mit überlappenden Primerpaaren analysiert. Es konnten zwei heterozygote Genvarianten, die zu einem nichtkonservativen Aminosäureaustausch führen, identifiziert werden: Isoleuzin gegen Threonin (I5236T) und Threonin gegen Methionin (T5549M). Das Ziel, der hier beschriebenen Untersuchungen, war es die Konsequenzen der Mutationen für die Protein-Protein-Interaktion zu charakterisieren.

### 3.2.1 Fusionsproteine von Ahnak

Die Ahnak-Fusionsproteine, die für die Bindungsstudien verwendet wurden, sind in Tabelle 3.4 einzeln aufgeführt. Dabei handelt es sich um Glutathion-S-Transferase- (GST) bzw. His-Tag-Fusionsproteine. Eine schematische Darstellung von Ahnak und die Lokalisation der, als GST- bzw. His-Tag-Fusionsproteine präparierten und in *E.coli*-Zellen expremierten, Fragmente zeigt Abbildung 3.23. Die Expression der  $\beta 2$ -Untereinheit erfolgte als GST-Fusionsprotein. Die genauen Aminosäuresequenzen der Ahnak-Fusionsproteine sind im Anhang Abb. 7.9-Abb. 7.11 dargestellt.

Fusionsprotein	Expression s-Vektor	Position des Ahnak- Fragmentes	Mutation/Position
Ahnak-C1 wt	GST	4646-5288	
Ahnak-C1 I5236T	GST	4646-5288	Isoleuzin gegen Threonin an Position 5236
Ahnak P3-P4 wt	GST	5453-5643	
Ahnak P3-P4 T5549M	GST	5453-5643	Threonin gegen Methionin an Position 5549
Ahnak P3-P4 P5544/5547A	GST	5453-5643	Prolin gegen Alanin an Position 5544/5547
Ahnak-C1/C wt	His-Tag	5215-5288	
Ahnak-C1/C I5236T	His-Tag	5215-5288	Isoleuzin gegen Threonin an Position 5236

Tab. 3.4: Ahnak-Fusionsproteine. Art des Expressionsvektors, Position und Größe des Ahnak-Fragmentes im gesamten Ahnak-Gen, Art und Position der eingefügten Mutationen: wt, Wildtyp; I, Isoleuzin; T, Threonin; M, Methionin; P, Prolin; A, Alanin; C, Carboxyl-Terminus; GST, Glutathion-S-Transferase

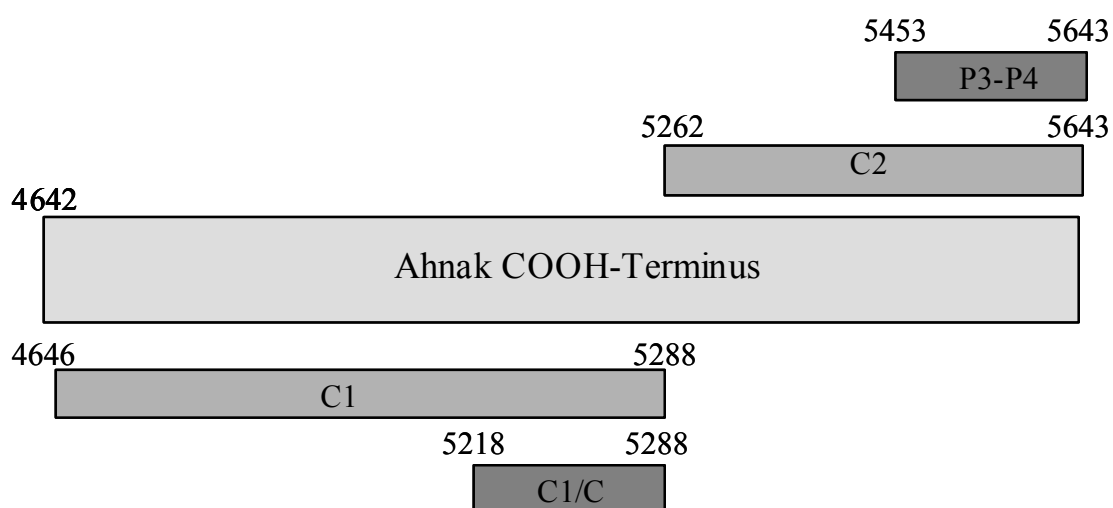


Abb. 3.23: Schematische Darstellung von Ahnak C-Terminus mit Lokalisierung der, als GST- und His-Tag-Fusionsproteine, präparierten Fragmente. Die Aminosäuresequenz wurde von der genomischen Ahnak-Sequenz abgeleitet (AC 004230).

Die erste Genvariante war an Position 5236, des Ahnak-Gens. Es handelt sich hierbei um eine Punktmutation, die die Veränderung des Triplets von ATT zu ACT zur Folge hatte. Sie bedingt den Austausch der hydrophoben Aminosäure Isoleuzin durch die polare Aminosäure Threonin. Der Basenaustausch führt eine neue A/wNI-Schnittstelle ein. Diese Genvariante wurde in die Fusionsproteine Ahnak-C1 I5236T und Ahnak-C1/C I5236T eingeführt. Bei einer Restriktionshydrolyse mit A/wNI werden die beiden Wildtypen Ahnak-C1 wt und Ahnak- C1/C wt linearisiert. Es ergeben sich Banden in Größe von 6910 bp bzw. 2785 bp. Die beiden mutierten Fusionsproteine Ahnak-C1 I5236T und Ahnak- C1/C I5236T enthalten eine zusätzliche Schnittstelle, so dass man jeweils 2 Banden erhält. Für Ahnak-C1 I5236T ergibt sich ein Bandenmuster von 5043 bp und 1867 bp, für Ahnak-C1/C I5236T ein Bandenmuster von 1908 bp und 855 bp (Abb. 3.24).

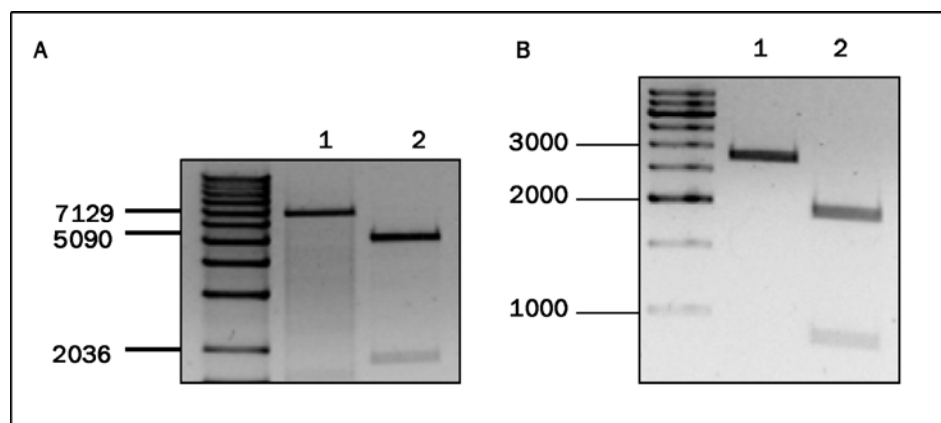


Abb. 3.24: Restriktionshydrolyse mit A/wNI. A) Ahnak-C1 wt (1), Ahnak-C1 I5236T (2) B) Ahnak- C1/C wt (1) Ahnak- C1/C I5236T (2)

Das zu erwartende Molekulargewicht der Ahnak-Fusionsproteine Ahnak-C1 wt und Ahnak-C1 I5236T lag bei 95 kDa und bei Ahnak- C1/C wt und Ahnak- C1/C I5236T bei 16 kDa. Um zu sehen, ob die Fusionsproteine auch „*in frame*“ exprimiert werden, wurde eine SDS-Gelelektrophorese und eine anschließende Coomassie-Blue-Färbung durchgeführt.

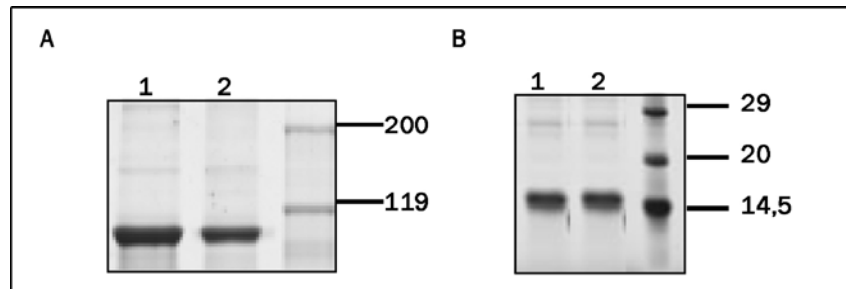


Abb. 3.25: Ahnak-Fragmente im GST- und His-Tag-Expressionsvektor exprimiert. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden jeweils 5 µg der Ahnak-Fusionsproteine aufgetragen. Die anschließende Anfärbung des Gels erfolgte mit Coomassie-Blue. A) GST-Fusionsproteine: Ahnak-C1 wt (1) und Ahnak-C1 I5236T (2) im SDS-Gel (10%) B) His-Tag-Fusionsproteine: Ahnak-C1/C I5236T (1) und Ahnak-C1/C I5236T (2) im SDS Gel (15%).

Die zweite Genvariante, die gefunden wurde, befindet sich an der Aminosäureposition 5549 und hat die Veränderung des Triplets ACG zu ATG zur Folge. Sie bedingt den Austausch der polaren Aminosäure Threonin durch die hydrophobe Aminosäure Methionin. Der Basenaustausch führt eine neue *Bst*XI-Schnittstelle ein. Diese Genvariante wurde in das Fusionsprotein Ahnak P3-P4 T5549M eingeführt. Weiterhin wurde an Position 5544 und 5547 die hydrophobe Aminosäure Prolin gegen die neutrale Aminosäure Alanin substituiert. Das Vorkommen von Prolin an dieser Stelle bildet ein PxxP-Motiv, eine prolinreiche Region, die eine potentielle SH3-Bindungsstelle darstellt.

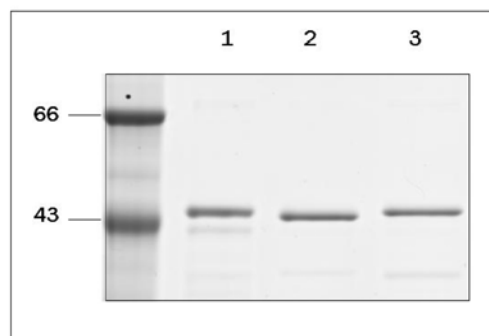


Abb. 3.26: Ahnak-Fragmente im GST-Expressionsvektor exprimiert. Für die SDS-Gelelektrophorese (10%) wurden jeweils 5 µg der Ahnak-Fusionsproteine aufgetragen. Die anschließende Anfärbung des Gels erfolgte mit Coomassie-Blue. 1: Ahnak P3-P4 wt (47 kDa), 2: Ahnak P3-P4 T5549M (47 kDa), 3: Ahnak P3-P4 P5544/5547A (47 kDa)



#### **3.2.2 Die Ahnak-Mutationen Ahnak-C1 I5236T und Ahnak-C1/C I5236T verstärken die Bindung mit der $\beta$ 2-Untereinheit des $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals**

Die Bindungsstudien wurden bei den GST-Fusionsproteinen Ahnak-C1 und Ahnak-C1 I5236T durch Ultrazentrifugation durchgeführt. Für die His-Tag-Fusionsproteine Ahnak-C1/C und Ahnak-C1/C I5236T wurde die Surface Plasmon Resonance-Technik (SPR) verwendet. Hierzu wurden die analytischen Ultrazentrifugationen von Prof. Joachim Behlke, MDC, Berlin, durchgeführt. Für die rekombinanten GST-Fusionsproteine:  $\beta$ 2-Untereinheit, Ahnak-C1 und Ahnak-C1 I5236T wurde eine molekulare Masse von 95 kDa bestimmt. Steigende Mengen von Ahnak-C1 bzw. Ahnak-C1 I5236T wurden mit 0,16  $\mu\text{M}$  der  $\beta$ 2-Untereinheit versetzt und bis zur Einstellung des Sedimentations-Gleichgewichtes zentrifugiert. In beiden Fällen, Ahnak-C1 Wildtyp und Ahnak-C1 I5236T (Mutation), ergab die Analyse einen 1:1 Komplex (Abb. 3.27 A, B). Entscheidend ist, dass der Austausch von Isoleuzin (Wildtyp) durch Threonin (Mutation) in Ahnak-C1 an Position 5236 einen Anstieg der Bindungsaffinität der  $\beta$ 2-Untereinheit zur Folge hat. Dies drückt sich in der abnehmenden Dissoziationskonstante von  $155 \pm 31$  nM (Wildtyp Ahnak-C1) auf  $96 \pm 17$  nM, für die Ahnak-C1 I5236T Mutation aus. Zusätzlich wurden diese Versuche unter den gleichen Bedingungen nach der Phosphorylierung der GST-Fusionsproteine durchgeführt. Die Phosphorylierung bewirkt beim Wildtyp, als auch bei der Mutation, eine Abschwächung der Bindung zur  $\beta$ 2-Untereinheit. Der  $K_D$ -Wert erhöht sich für Ahnak-C1 auf  $218 \pm 14$  nM und bei Ahnak-C1 I5236T auf  $147 \pm 16$  nM.

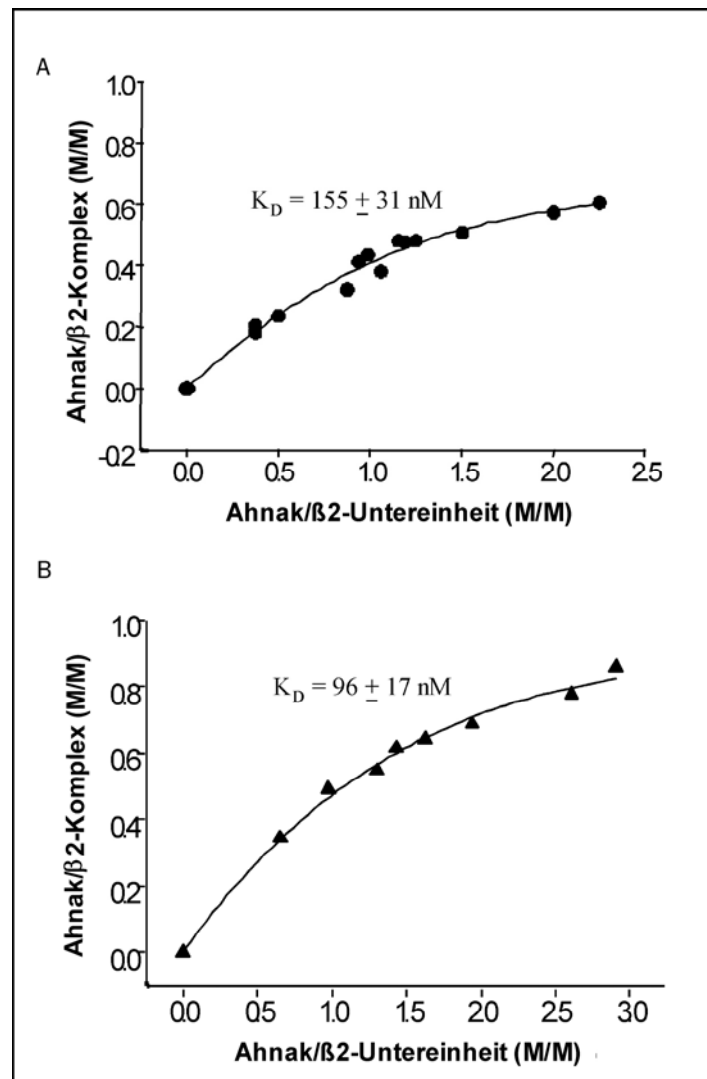


Abb. 3.27: Interaktion von Ahnak-C1 und Ahnak-C1 I5236T mit der  $\beta$ 2-Untereinheit, bestimmt durch analytische Ultrazentrifugation. Analyse der Interaktion von A) Ahnak-C1 mit der  $\beta$ 2-Untereinheit B) Ahnak-C1 I5236T mit der  $\beta$ 2-Untereinheit; gelöst in 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) mit 500 mM NaCl und bei 10°C. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten erfolgte mit dem Programm: Polymole (Behlke, 1997). Die  $K_D$ -Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben.

Um die Bindungsstelle weiter einzuengen, wurden die beiden His-Tag-Fusionsproteine Ahnak-C1/C und Ahnak-C1/C I5236T, wie in Material und Methoden beschrieben (2.2.18), hergestellt. Die Interaktion der beiden His-Tag-Fusionsproteine mit der  $\beta$ 2-Untereinheit (phosphoryliert und nicht phosphoryliert) wurde mit der SPR-Methode durchgeführt. Zuerst wurden die beiden Fusionsproteine Ahnak-C1/C und Ahnak-C1/C I5236T als Liganden an der Dextran-Oberfläche eines Sensorchips (CM5 Sensor Chip) auf unterschiedlichen Spuren immobilisiert (3,2 ng/mm<sup>2</sup>). Abb. 3.28 zeigt das

Sensorgramm des Ahnak-C1/C I5236T Fusionsproteins mit den verschiedenen Konzentrationen der  $\beta$ 2-Untereinheit (5  $\mu$ M–11  $\mu$ M). Die Assoziation nimmt mit steigender Konzentration der  $\beta$ 2-Untereinheit zu. Das zeigt sich in der Größe der Responce-Units (RU), die von 186 RU, bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M, bis zu 490 RU, bei einer Konzentration von 11  $\mu$ M, reichen. In Abb. 3.29 A, B ist das Sensorgramm der beiden Fusionsproteine Ahnak-C1/C und Ahnak-C1/C I5236T mit der  $\beta$ 2-Untereinheit, in einer Konzentration von 8  $\mu$ M dargestellt, wobei die Mutation mit 410 RU eine stärkere Bindung als der Wildtyp mit 305 RU aufweist. Aus der langsameren Dissoziation der Mutation, bei der die Aminosäure Isoleuzin gegen Threonin ausgetauscht wurde, lässt sich auf eine bessere Bindung an die  $\beta$ 2-Untereinheit schließen, als es beim Wildtyp der Fall ist.

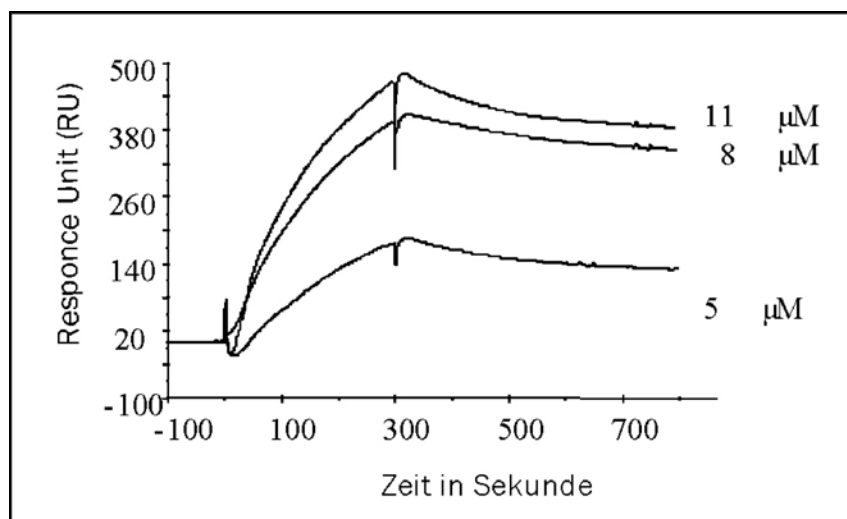


Abb. 3.28: Bindungs-Sensorgramme der  $\beta$ 2-Untereinheit (5  $\mu$ M–11  $\mu$ M) mit dem immobilisiertem Fusionsprotein Ahnak-C1/C I5236T (3,2 ng/mm<sup>2</sup>). Die spezifische Bindung der  $\beta$ 2-Untereinheit zu dem immobilisierten Ahnak-Fragment erhält man nach Abzug des Blanks.

Peptid	$k_{on}$ in $M^{-1}s^{-1}$	$k_{off}$ in $s^{-1}$	$K_D$ in $\mu M$	Anzahl (N)
ahnak-5215-88	$106,23 \pm 24,83$	$3,49 \times 10^{-3} \pm 0,0009$	$33,27 \pm 4,95$	3
ahnak-5215-88_I5236T	$166,33 \pm 4,37$	$1,79 \times 10^{-3} \pm 0,0006$	$10,97 \pm 3,73$	3

Tab. 3.5: Die kinetischen Konstanten  $k_{on}$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) und  $k_{off}$  ( $s^{-1}$ ), sowie der  $K_D$ -Wert der beiden His-Tag-Fusionsproteine Ahnak-5215-88 (WT) und Ahnak-5215-88/I5236T (Mutation) sind angegeben.  $k_{on}$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) misst die Geschwindigkeit der Assoziation von Ligand und Bindungsprotein.  $k_{off}$  ( $s^{-1}$ ) charakterisiert die Geschwindigkeit der Dissoziation des Liganden vom Bindungsprotein-Liganden-Komplex,  $K_D$  ist die Dissoziationskonstante. Die Mittelwerte sind  $\pm$  SEM angegeben.

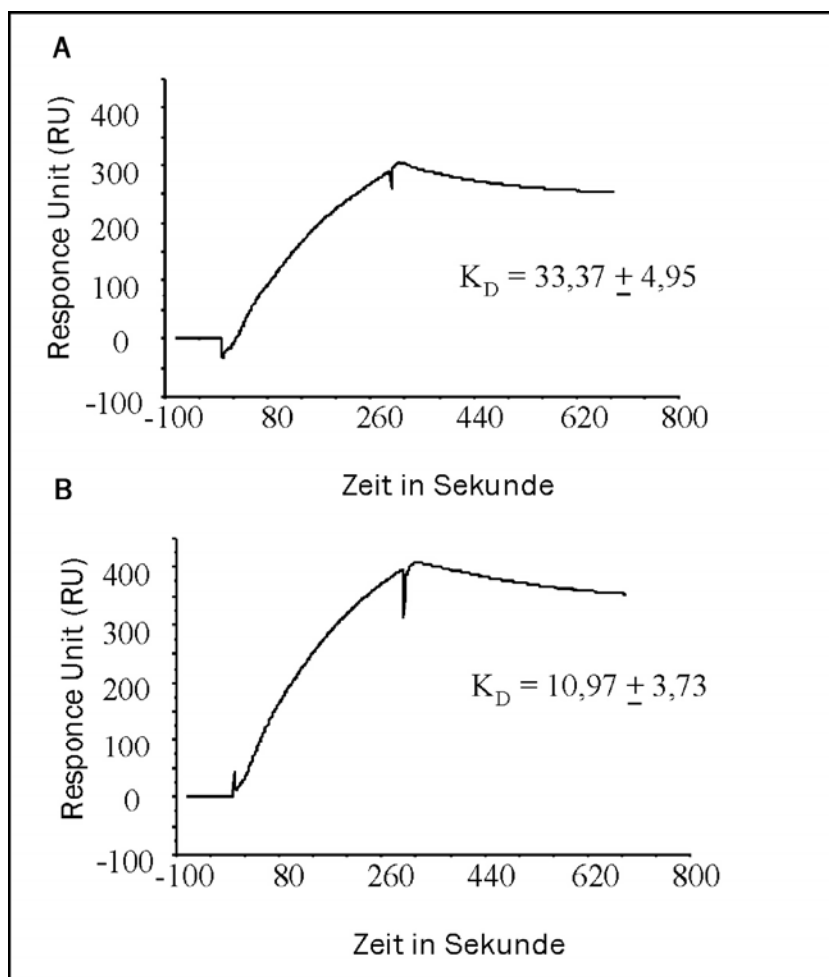


Abb. 3.29: Bindungs-Sensorgramme der  $\beta 2$ -Untereinheit mit den immobilisierten Fusionsproteinen Ahnak-C1/C (A) und Ahnak-C1/C I5236T (B). Ahnak-C1/C und Ahnak-C1/C I5236T wurden auf einer Dextran-Oberfläche immobilisiert ( $3,2 \text{ ng/mm}^2$ ). Die spezifische Bindung der  $\beta 2$ -Untereinheit an die immobilisierten Ahnak-Fragmente erhält man nach Abzug

des Blanks. Repräsentativ sind hier die Sensorgramme mit der  $\beta 2$ -Untereinheit (8  $\mu\text{M}$ ) dargestellt.

#### **3.2.3 Die Mutation T5549M im Ahnak-P3-P4-Fragment beeinflusst die Interaktion zur $\beta 2$ -Untereinheit des $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals nicht**

Analytische Ultrazentrifugationen wurden entweder mit dem Wildtyp Ahnak P3-P4 oder mit der Mutation Ahnak P3-P4 T5549M, in Kombination mit der  $\beta 2$ -Untereinheit, durchgeführt. Für das rekombinante  $\beta 2$ -Protein wurde ein molekulares Gewicht von 95 kDa bestimmt, für Ahnak P3-P4 ein Gewicht von 46 kDa (für beide: Wildtyp und Mutation). Das bedeutet, dass beide Proteine in Lösung als Monomere vorliegen. Steigende Mengen von Ahnak-P3-P4 bzw. Ahnak-P3-P4 T5549M wurden mit 0,35  $\mu\text{M}$  der  $\beta 2$ -Untereinheit versetzt und bis zur Einstellung des Sedimentations-Gleichgewichtes zentrifugiert. Die Menge des Ahnak-P3-P4-Komplexes steigt mit zunehmender molaren Ratio von Ahnak P3-P4/ $\beta 2$ -Untereinheit für den Wildtyp (Abb. 3.30A, geschlossene Kreise), genau wie für die Mutation (Abb. 3.30A, offene Dreiecke) an. Bis zu einer molaren Ratio von  $\sim 4$  wurde ein 1:1 Komplex gebildet. Wird die molare Ratio auf über 6 erhöht, bindet mehr als ein Ahnak-P3-P4-Molekül an die  $\beta 2$ -Untereinheit. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die  $\beta 2$ -Untereinheit noch weitere Bindungsstellen zu Ahnak aufweist. Der  $K_D$ -Wert für die hochaffine Bindungsstelle beträgt für den Wildtyp  $62 \pm 18$  nM und für die Mutation  $57 \pm 12$  nM. Die Dissoziationskonstante für die niederaffine Bindungsstelle liegt bei Wildtyp und Mutation zwischen 200-300 nM.

#### **3.2.4 Das PxxP-Motiv, in der C-terminalen Ahnak-Domäne, ist eine wichtige Bindungsstelle zur $\beta 2$ -Untereinheit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals**

Die C-terminale Ahnak-Region weist ein PxxP-Motiv auf (Abb. 3.30B). Das prolinreiche Motiv stellt eine potentielle Bindungsstelle für die SH3-Domäne der  $\beta 2$ -Untereinheit dar. Um die funktionelle Bedeutung des PxxP-Motivs für die Bindung mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal- $\beta 2$ -Untereinheit zu untersuchen, wurden beide Prolinreste gegen die neutrale Aminosäure Alanin ausgetauscht. In der analytischen Ultrazentrifugation erwiesen sich beide als Monomere. Steigende Mengen von Ahnak-P3-P4 P5544/5547A wurden mit  $0,4 \mu\text{M}$  der  $\beta 2$ -Untereinheit versetzt und bis zur Einstellung des Sedimentations-Gleichgewichtes zentrifugiert und analysiert. Die Menge des Ahnak-P3-P4-P5544/5547A-Komplexes steigt mit zunehmender molaren Ratio von Ahnak P3-P4 P5544/5547A/ $\beta 2$ -Untereinheit (Abb. 3.30A, offene Kreise) an. Es ist aber im Gegensatz zum Wildtyp Ahnak P3-P4 (Abb. 3.30A, geschlossene Kreise) keine zweite Bindungsstelle mehr zu beobachten. Die Bindung zur  $\beta 2$ -Untereinheit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals nimmt stark ab, was sich in der erhöhten Dissoziationskonstante ausdrückt. Der  $K_D$ -Wert für die Bindungsstelle beträgt  $1,15 \pm 0,1 \mu\text{M}$ .

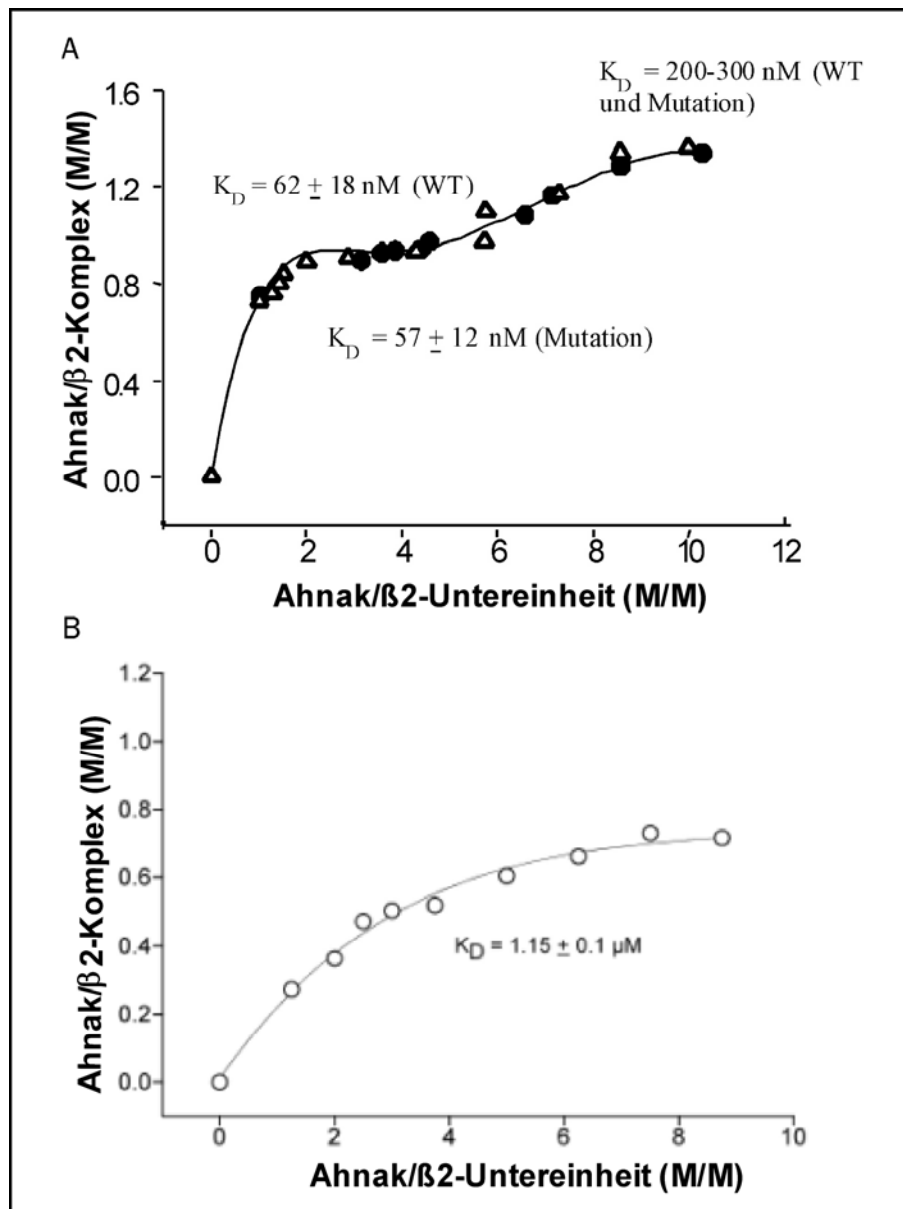


Abb. 3.30: A) Interaktion von Ahnak P3-P4 und Ahnak P3-P4 T5549M mit der  $\beta$ 2-Untereinheit, bestimmt durch analytische Ultrazentrifugation. Unterschiedliche Mischungsverhältnisse, bestehend aus  $0,35 \mu\text{M}$  der  $\beta$ 2-Untereinheit und einer variablen Menge von Ahnak P3-P4 mit Threonin (Wildtyp, geschlossene Kreise) oder Methionin (Mutation, offene Dreiecke), wurden bis zum Sedimentationsgleichgewicht zentrifugiert. B) Interaktion von Ahnak-P3-P4 P5544/5547A mit der  $\beta$ 2-Untereinheit, bestimmt durch analytische Ultrazentrifugation. Unterschiedliche Mischungsverhältnisse, bestehend aus  $0,4 \mu\text{M}$  der  $\beta$ 2-Untereinheit und einer variablen Menge von Ahnak P3-P4 P5544/5547A, wurden bis zum Sedimentationsgleichgewicht zentrifugiert. Die Fusionsproteine waren in Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) mit  $500 \text{ mM}$  NaCl, bei  $10^\circ\text{C}$  gelöst. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten erfolgte mit dem Programm Polymole (Behlke, 1997). Die  $K_D$ -Werte sind  $\pm$  SEM angegeben.

### 3.2.5 Die Bindung von Ahnak-C1-WT und Ahnak-C1 I5236T wird durch PKA-Phosphorylierung abgeschwächt

Die Ultrazentrifugationsversuche mit den Fusionsproteinen Ahnak-C1-WT und Ahnak-C1 I5236T (3.2.2) wurden zusätzlich nach der Phosphorylierung der GST-Fusionsproteine, unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Phosphorylierung bewirkt beim Wildtyp, sowie bei der Mutation eine Abschwächung der Bindung zur  $\beta 2$ -Untereinheit. Der  $K_D$ -Wert erhöht sich für Ahnak-C1 auf  $218 \pm 14$  nM und bei Ahnak-C1 I5236T steigt er auf  $147 \pm 16$  nM.

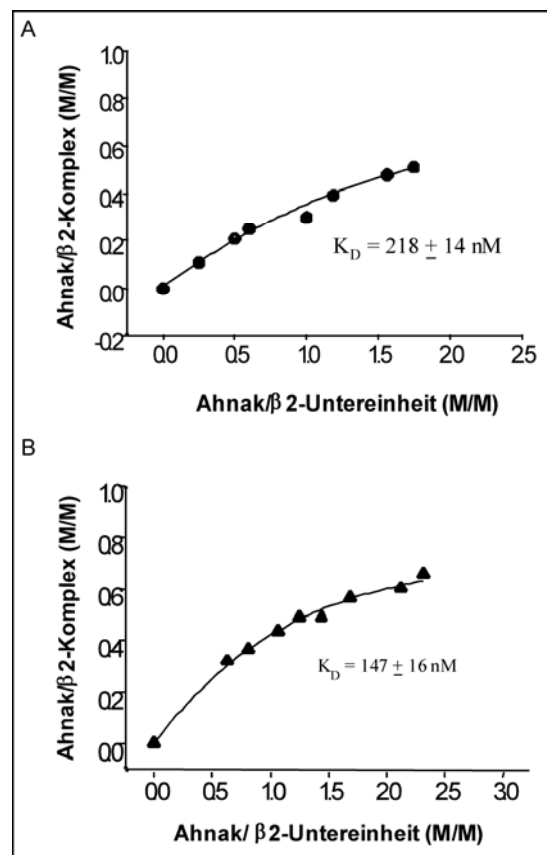


Abb. 3.31: Interaktion der phosphorylierten Fusionsproteine Ahnak-C1 und Ahnak-C1 I5236T mit der phosphorylierten  $\beta 2$ -Untereinheit, bestimmt durch analytische Ultrazentrifugation. Analyse der Interaktion von A) Ahnak-C1 mit der  $\beta 2$ -Untereinheit B) Ahnak-C1 I5236T mit der  $\beta 2$ -Untereinheit, gelöst in 50 mM Tris/HCl (pH 7,4) mit 500 mM NaCl und bei 10°C. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten erfolgte mit dem Programm Polymole (Behlke, 1997). Die  $K_D$ -Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.



## 4. Diskussion

Ahnak wurde Anfang 1990 als Tumorgen beschrieben. Es zeigte die höchste Expression in ruhenden oder ausdifferenzierten Zellen. In proliferierenden Zellen, Neuroblastom-Zellen und kleinen Lungenkarzinomen war Ahnak dagegen reprimiert (Shtivelman, 1993). Ich habe in dieser Arbeit untersucht, ob durch Erniedrigung der Ahnakexpression die Proliferationsrate erhöht werden kann. Jedoch konnte ich in dieser Arbeit in Proliferationstests mit Ahnak-defizienten embryonalen Stammzellen (ES) keine Veränderung der Proliferationsrate feststellen. Diese Beobachtung stimmt mit der Literatur überein (Kouno, 2004).

Homozygote Ahnak-Knock-Out-Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar (Komuro, 2004; Kouno, 2004). Histologische Untersuchungen der Haut von Ahnak-Knock-Out-Mäusen zeigte in verschiedenen Altersstadien keine Abnormität der Haarfollikel oder der Talgdrüsen. Ebenso konnten immunhistochemische Untersuchungen belegen, dass die Epidermiszellen aus mutierten Mäusen die gleichen Hautdifferenzierungsmarker (Laminin5, Keratin5, Keratin1), wie die normalen Epidermiszellen, exprimieren. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Haut zeigten, dass die Ultrastruktur der interzellularen Junctions der Epidermis von mutierten Mäusen nicht von denen der Wildtyp-Mäuse zu unterscheiden ist. Eine spontane Tumorentwicklung oder ein entartetes Wachstumsverhalten konnte beim Knock-Out-Stamm, vergleichend mit dem Wildtyp-Stamm, nicht beobachtet werden (Kouno, 2004).

Findet man bei Mäusen mit funktionell eliminierten Genen nur einen geringfügig ausgeprägten Phänotyp, dann ist dies ein Hinweis darauf, dass andere Moleküle den Wegfall kompensieren und somit einen Funktionsverlust der Zellen und Organe verhindern.

Das Ausbleiben eines ausgeprägten Phänotyps bei Ahnak-Knock-Out-Tieren stimmt allerdings nicht mit veröffentlichten Ergebnissen überein. Es konnte gezeigt werden, dass die Erniedrigung der Ahnak-Expression mittels spezifischer siRNA, die gegen die Repeat-Domäne der Ahnak-mRNA gerichtet ist, die kortikale Aktin-Reorganisation hemmte und die Zellhöhe erheblich reduzierte (Benaud, 2004).

Es ist möglich, dass die ahnakspezifische siRNA auch andere Proteine, mit ähnlicher Sequenz in ihrer Expression unterdrückt. Beispielsweise besitzt Titin eine PEVK-Domäne, die der Ahnak-Repeat-Domäne sehr ähnlich ist (Wernyj, 2001). Sucht man mit der Ahnak-Repeat-Domäne nach ähnlichen Sequenzen in der Datenbank, dann erhält man unter anderem auch Ahnak2 (Komuro, 2004), ein Ahnak-ähnliches Gen. Charakteristisch für beide Ahnak-Isoformen ist die zentrale Mitteldomäne aus repetitiven Einheiten. Von daher ist es denkbar, dass im siRNA-Experiment (Benaud, 2004) die Expression beider Ahnak-Isoformen unterdrückt wurde.

Unsere eigenen, morphologischen Untersuchungen konnten aber zeigen, dass die adulten Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten stark verändert waren. Besonders die Zelllänge war dabei signifikant reduziert. Da die Sarkomerlänge unverändert blieb, scheint die geringere Zelllänge nicht auf eine erhöhte Kontraktur der isolierten Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten zu beruhen.

Ahnak wurde in Kardiomyozyten verschiedener Säuger (Mensch, Ratte, Schwein, Maus) nachgewiesen und auf der Ebene der Plasmamembran lokalisiert. In Kopäzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Ahnak mit der regulatorischen  $\beta 2$ -Untereinheit des kardialen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals interagiert (Haase *et al.* 1999). Diese Interaktion hemmt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit des Kanals. Diese Ergebnisse wurden mittels Peptide-Competition-Experimenten und Patch-Clamp-Analysen adulter Rattenkardiomyozyten gewonnen (Alvarez, 2004). Ahnak wird nach Stimulierung des Herzens phosphoryliert (Haase *et al.* 1999) All diese

Befunde belegen, dass Ahnak eine wichtige Rolle bei der Regulation der elektromechanischen Kopplung des Herzmuskels spielt. Der molekulare Mechanismus der  $\beta$ -adrenergern (sympathischen) Stimulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals ist jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es daher, die funktionelle Bedeutung von Ahnak im Herzen durch ein Ahnak-Defizienzmodell und durch Mutation des Ahnak-Proteins zu untersuchen. Mit Hilfe des Defizienzmodells sollte die Voraussage überprüft werden, ob die funktionelle Eliminierung der Ahnak-Expression zu einer chronischen Steigerung der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Leitfähigkeit führt, was auf der Ebene der Kardiomyozyte die Kontraktion und das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal deutlich erhöhen sollte. Auch die intrinsischen kontraktile Eigenschaften auf der Ebene des gesamten Herzens sollten erhöht sein. Außerdem könnten, auf Grund der chronisch gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Belastung der Herzmuskelzellen, hypertrophe Prozesse beobachtet werden.

Untersuchungen von 3 Monate alten, adulten, homozygoten Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten ergaben einen schwach veränderten kardialen Phänotyp. Neben den vorher erwähnten morphologischen Veränderungen war der diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel unter Basalbedingungen bei den Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten signifikant erhöht. Es konnte auch eine Verringerung der  $\beta$ -adrenergen Stimulierung beobachtet werden, diese war aber statistisch nicht signifikant.

Die geringfügig ausgeprägte Minderung der Iso-Stimulierbarkeit isolierter Einzelzellen könnte darauf zurückzuführen sein, dass Ahnak-Knock-Out-Mäuse nur Kardiomyozyten mit geringer Verkürzungsamplitude entwickelten. Dagegen entwickelten Wildtyp-Mäuse Kardiomyozyten sowohl mit geringer als auch mit hoher Verkürzungsamplitude. Wie ich in dieser Arbeit zeigen konnte, war die Zellpopulation mit hoher Verkürzungsamplitude genau die, die sich durch eine geringe Iso-

Stimulierbarkeit auszeichnete. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Stones (Stones, 2005) überein. Es ist daher möglich, dass eine tatsächlich vorhandene eingeschränkte  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit von Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten, im Alter von 3 Monaten, maskiert wurde. Zum Einen könnte es sein, dass Wildtyp-Kardiomyozyten auf Grund ihres beträchtlichen Anteils an Kardiomyozyten, mit hoher Verkürzungsamplitude im Mittel, nur gering mit Iso stimulierbar sind. Zum Anderen, dass die Ahnak-Knock-Out-Tiere wegen ihres hohen Anteils an Kardiomyozyten, mit niedriger Verkürzungsamplitude, aber hoher Iso-Stimulierbarkeit, immer noch eine beträchtliche Iso-Stimulierbarkeit besitzen.

Die Untersuchungen von 6 Monate alten, adulten Kardiomyozyten homozygoter Ahnak-Knock-Out-Mäuse zeigten signifikante Unterschiede. So waren die basalen diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte von Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten, sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiegs- und -Abfallgeschwindigkeit, unter basalen Bedingungen, statistisch signifikant höher als beim Ahnak-Wildtyp. Diese Ergebnisse decken sich mit der erwarteten „Enthemmung“ des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals durch Ahnakdefizienz, da insbesondere die Inaktivierung des Kanals durch Ahnak reguliert wird (Alvarez, 2004). Der signifikant erhöhte systolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, bedingt durch den ungebremsten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten, könnte durch eine gesteigerte Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe im SR kompensiert werden.

Die  $\beta$ -adrenerge Stimulierung der Kardiomyozyten durch Isoprenalin ist zwar beim 6 Monate alten Knock-Out und Wildtyp vorhanden, wird aber bei den Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten abgeschwächt. In Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten ist die Stimulierung der Anstiegsgeschwindigkeit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration tendenziell vorhanden, jedoch nicht statistisch signifikant. Eine verminderte Isoprenalin-Antwort in Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten ist in Einklang mit der Hypothese, dass Ahnak, wie später ausgeführt, ein negativer Regulator der Signaltransduktion vom  $\beta$ -adrenergen Rezeptor zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ist. Der ausgeprägte positiv

lusitrope Effekt, d. h. die beschleunigte Erschlaffung über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückspeicherung in das SR, durch Isoprenalin, ist in Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten nicht verändert.

Die Analyse der Zellverkürzungsparameter ergab, dass eine Ahnakdefizienz in adulten Kardiomyozyten tendenziell einen positiv inotropen und positiv lusitropen Effekt unter Basalbedingungen hat. Diese Effekte sind jedoch statistisch nicht signifikant. Dagegen ist die abgeschwächte Isoprenalin-Antwort bei den Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten deutlich, sowohl in der Verkürzungs- als auch in der Erschlaffungsgeschwindigkeit.

Die späte Ausprägung eines Phänotyps in einem Knock-Out-Maus-Modell ist nicht ungewöhnlich. Im Dysferlin-defizienten Mäusestamm SJL/J konnte erst nach 32 Wochen gezeigt werden, dass der Komplement-inhibitorische Faktor CD55 im Skelettmuskel herunterreguliert war (Wenzel *et al.* 2005).

Die vorausgesagte reduzierte  $\beta$ -adrenerge Stimulierbarkeit Ahnak-defizienter Mäuse konnte auf Zellebene und am isoliert perfundierten Herzen signifikant ermittelt werden. Die basalen kontraktile Parameter waren ebenfalls bei Ahnak-Knock-Out-Herzen erhöht.

Untersuchungen der passiven Kontraktionseigenschaften ergaben, dass bei Vorlasterhöhung die Herzen der Ahnak-defizienten Mäuse einen geringeren diastolischen Widerstand aufbauen, als die Herzen von Ahnak-Wildtyp-Mäusen. Diese Daten lassen sich durch Ahnaks Rolle in der Zytoarchitektur erklären. Ahnak stabilisiert durch Bindung an F-Aktin das Zytoskelett (Hohaus, 2002). In Ahnak-defizienten Herzen ist die Zytoarchitektur offensichtlich beeinträchtigt. Ich konnte in dieser Arbeit zeigen, dass die Dehnbarkeit des Herzen größer wird, d.h. es leistet einer zunehmenden Belastung weniger Druckwiderstand.

Zusätzlich wurden von mir in Patientenpopulationen mit Kardiomyopathien

nach natürlich vorkommenden Mutationen des Ahnak-Gens gesucht. Im Verlauf dieser Arbeit gelang es in dem untersuchten Patientengut zwei heterozygote Missensemutationen zu identifizieren. Die heterozygote Genvariante, die zu einem nichtkonservativen Aminosäureaustausch von Isoleuzin (hydrophob) mit der polaren Aminosäure Threonin (I5236T) führte, wurde bei 5 von 192 Patienten, mit schweren Kardiomyopathien, identifiziert. Dieselbe Missensemutation wurde auch bei 2 von 96 Kontrollprobanden, deren Herzfunktion als normal angesehen wird, entdeckt. Allerdings handelt es sich dabei um kein ausreichend charakterisiertes Kollektiv, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei den positiven Kontrollprobanden, in späteren Jahren, Kardiomyopathien auftreten könnten.

Es ist möglich, dass eine Missensemutation eine Erniedrigung der Bindung von Ahnak an die regulatorische  $\beta 2$ -Untereinheit zur Folge hat. Durch die fehlende Hemmung von Ahnak auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals könnten hypertrophe Prozesse ausgelöst werden, die sich chronisch zu einer Kardiomyopathie entwickeln könnten (Frey, 2000).

Um Veränderungen im Bindungsverhalten untersuchen zu können, wurde die Mutation I5236T in ein GST-Fusionsprotein, dass den gesamten rekombinanten Ahnak-C1-Terminus enthält, eingeführt. Die Substitution von Isoleuzin durch Threonin, an Position 5236, verstärkte signifikant (1,6-fach) die Bindung zur  $\beta 2$ -Untereinheit.

Um die Bindungsstelle in der Nähe der Mutation an Position 5236 weiter einzuengen, wurden zwei weitere Fusionsproteine (Kontroll-Ahnak-5215-88 und Ahnak-5215-88/I5236T) hergestellt. Das Molekulargewicht beider Fusionsproteine lag bei 16 kDa. In Ultrazentrifugations-Versuchen hatten sie allerdings ein Molekulargewicht von ca. 80 kDa. Dies deutet darauf hin, dass beide Fusionsproteine Multimere bilden. Aus diesem Grund wurde die Interaktion dieser beiden Fusionsproteine mittels Surface Plasmon Resonance (SPR) durchgeführt. Auch in diesen Experimenten wurde das

mutierte Fusionsprotein deutlich (3-fach) besser gebunden als das Kontroll-Ahnak.

Diese stärkere Bindung von Ahnak mit der Missensemutation I5236T könnte beim Menschen *in vivo* eine verstärkte Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit des kardialen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals, und somit eine reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierung und Kontraktion der Kardiomyozyten zur Folge haben, was die Herzleistung insgesamt beeinträchtigen würde. Solche Zustände können systemisch, durch eine Steigerung des sympathischen Tonus, kompensiert werden. Auch in Tiermodellen ist bekannt, dass durch die chronische Steigerung des Sympathikotonus Kardiomyopathien erzeugt werden können (Cuda, 1993; Geisterfer-Lowrance, 1996; Robbins, 2000); James *et al.* 1999). Da uns nur sehr kleine Familien zur Verfügung standen, konnten keine genetischen Assoziationsstudien, mit denen diese Hypothese bestätigt werden könnte, durchgeführt werden.

Bei der Analyse der Patienten mit Kardiomyopathien konnte ich noch eine weitere heterozygote Ahnak-Mutation in der C2-Domäne identifizieren, die zu einem Austausch der polaren Aminosäure Threonin gegen die hydrophobe Aminosäure Methionin führt (T5549M). Von 192 Patienten, mit schweren Kardiomyopathien, trug 1 Patient diese Mutation im Genom, ebenso wie ein Proband der Kontrollgruppe. Für die Bindungsstudien wurden rekombinante Fusionsproteine ohne (Kontroll-Ahnak-P3-P4 (5453-5643)) und mit Mutation (Ahnak-P3-P4 T5549M) hergestellt. Das rekombinante Ahnak-Fragment 5453-5643 mit der T5549M Mutation zeigte in Ultrazentrifugationsversuchen exakt dasselbe Bindungsverhalten, wie das Kontroll-Fusionsprotein (Kontroll-Ahnak-P3-P4 (5453-5643)).

Das Ahnak-Fragment 5453-5643 hat 2 Bindungsstellen zur  $\beta 2$ -Untereinheit, eine hochaffine und eine niederaffine. In dieser Arbeit sollten diese beiden, verschiedenen Bindungsstellen identifiziert werden. Insbesondere das PxxP-Motiv an Position 5544/5547 ist eine potentielle Bindungsstelle. Um einen möglichen Einfluss des PxxP-Motivs auf die

Bindung zwischen der C-terminalen Ahnak-Domäne und der  $\beta 2$ -Untereinheit untersuchen zu können, wurden die beiden hydrophoben Aminosäuren Prolin gegen die neutrale Aminosäure Alanin substituiert. Interaktionsstudien zeigten, dass durch diesen Ala-Scan die hochaffine Bindungsstelle verloren ging, während eine niederaffine Bindung erhalten blieb.

Das PxxP-Motiv stellt einen potentiellen Bindungspartner für die SH3-Domäne der  $\beta 2$ -Untereinheit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals dar. Die SH3-Domäne bildet zwei Bindungstaschen durch eine antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur, die jeweils ein xP-Motiv erkennen und an diese binden (Zarrinpar, 2003). Auch die SH3-Domäne der  $\beta 2$ -Untereinheit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bildet eine  $\beta$ -Faltblattstruktur und hydrophobe Einkerbungen (Chen, 2004; McGee, 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass es sich bei dem PxxP-Motiv um die hochaffine Bindungsstelle zur  $\beta 2$ -Untereinheit handelt, die durch Ala-Scan zu einer niederaffinen Bindungsstelle mutiert werden kann.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der funktionellen Konsequenzen der Ahnak-Phosphorylierung. Ahnak wird nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation *in vivo* über die PKA phosphoryliert (Haase, 1999). Um den Einfluss der Phosphorylierung auf die Ahnak-C1/ $\beta 2$ -Bindung zu untersuchen, wurden die beiden Fusionsproteine: Kontroll-Ahnak-C1 und Ahnak-C1 I5236T, sowie die  $\beta 2$ -Untereinheit, mittels katalytischer Untereinheit der PKA, phosphoryliert. Die daraufhin eintretende signifikante (~50%) Abschwächung der Bindung zur  $\beta 2$ -Untereinheit spricht für die große Bedeutung dieser posttranslationalen Modifikation für die elektromechanische Kopplung.

Die signifikante Erniedrigung der Interaktionsstärke zwischen Ahnak und der regulatorischen  $\beta 2$ -Untereinheit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals durch PKA-Phosphorylierung könnte die Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromes aufheben und



verantwortlich sein für die positiv inotrope Wirkung sympathischer Stimulation. Stimulation adrenerger Rezeptoren durch Noradrenalin oder Adrenalin erhöht über eine  $G_s$ -proteinabhängige Steigerung der Acetylcholin-Aktivität die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Dies aktiviert die PKA, welche durch Phosphorylierung von Ahnak und der  $\beta_2$ -Untereinheit die Suppression der  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals aufhebt. Dieser molekulare Mechanismus kann dann die positiv inotrope Wirkung sympathischer Stimulation erklären: Durch Steigerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromes des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den RyR, was wiederum zu einer Erhöhung der Kraftentwicklung der Myofibrillen führt.

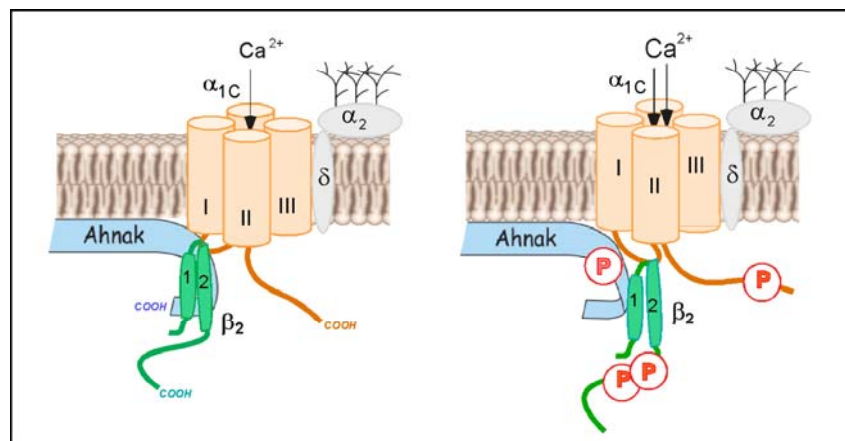


Abb. 4.1: Modell des Ahnak-Komplexes in Kardiomyozyten. Das Schema zeigt die Rolle von Ahnak während der  $\beta$ -adrenergen Stimulation des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. A) Im Ruhezustand ist die Kanalaktivität durch die starke Interaktion zwischen dem dephosphorylierten Ahnak-Protein und der dephosphorylierten  $\beta_2$ -Untereinheit eingeschränkt. B) Die PKA-Phosphorylierung von Ahnak und/oder der  $\beta_2$ -Untereinheit hebt die inhibitorischen Effekte auf (Haase, 2007).

In dieser Arbeit konnte daher erstmals gezeigt werden, dass durch posttranslationale Modifikation des C-Terminus von Ahnak und der  $\beta_2$ -Untereinheit, durch PKA-abhängige Phosphorylierung, die Bindung zur  $\beta_2$ -Untereinheit abgeschwächt und dadurch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals erhöht werden kann. Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen der Ahnak-Defizienzmodelle, die eine signifikante verringerte  $\beta$ -adrenere Ansprechbarkeit besitzen. Dies könnte ein neuer Ansatz sein, um den positiv inotropen Effekt des Sympathikus zu erklären. Erstmals konnte das

PxxP-Motiv im Ahnak-C-Terminus als wesentliches und hochaffines Bindungsmotiv für die Ahnak/ $\beta$ 2-Interaktion identifiziert werden. Missensemutationen in Ahnak können die Bindung an die  $\beta$ 2-Untereinheit erheblich beeinflussen und Kardiomyopathien hervorrufen.

## 5. Zusammenfassung

Ahnak ist ein ubiquitäres Protein, das an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt ist. In der Herzmuskelzelle ist Ahnak überwiegend am Sarkolemma lokalisiert und bildet unter anderem Multiproteinkomplexe mit Aktin und dem L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal. Dies und die posttranslationale Modifikation durch die PKA-Phosphorylierung lässt vermuten, dass Ahnak eine Schlüsselrolle bei der Erhaltung der Zellmorphologie und der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalaktivität, durch sympathische Stimulation des Herzens, spielt. Die wichtigsten Befunde meiner Arbeit sind:

1. Die Zellproliferation wird nicht durch Ahnak beeinflusst. In Ahnak-defizienten embryonalen Stammzellen war die Proliferationsrate nicht verändert.
2. Ahnak reguliert das Längenwachstum adulter Kardiomyozyten. Die Gesamtzelllänge isolierter adulter Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten war gegenüber den Ahnak-Wildtyp-Kardiomyozyten signifikant reduziert.
3. Der diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel adulter Kardiomyozyten wird durch Ahnak determiniert. In adulten Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten war der diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel erhöht. Diese Beobachtung spricht für eine „Enthemmung“ des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals bei Ahnakdefizienz.
4. Die kardialen Kontraktionseigenschaften werden durch Ahnak beeinflusst. In adulten Ahnak-Knock-Out-Kardiomyozyten war die basale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit erhöht. Ahnakdefizienz in adulten Kardiomyozyten löste einen positiv inotropen und positiv lusitropen Effekt aus.
5. Ahnak erhält den normalen diastolischen Ventrikeldruck. Isoliert perfundierte Ahnak-Knock-Out-Herzen bauten einen geringeren

diastolischen Druckwiderstand auf. Dies könnte auf einer verringerten Stabilität des Zytoskelettes beruhen.

6. Missensmutationen beeinflussen das Bindungsverhalten von Ahnak. Der Aminosäureaustausch I5236T verstärkte die Bindung zur  $\beta$ 2-Untereinheit. Das PxxP-Motiv in der C-terminalen Ahnak-Domäne ist eine hochaffine  $\beta$ 2-Bindungsstelle. Substitution von Prolin gegen Alanin verringert die Bindung dramatisch. Der Aminosäureaustausch T5549M ist funktionell stumm.
7. Ahnak reguliert die sympathische Stimulierung des Herzens. In Bindungsstudien verminderte die PKA-abhängige Phosphorylierung die Bindung von Ahnak zur  $\beta$ 2-Untereinheit. Im isoliert perfundierten Herzen waren Ahnak-Knock-Out-Herzen geringer  $\beta$ -adrenerg stimulierbar. Diese Beobachtungen bestätigen die Hypothese, dass Ahnak die  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion unterdrückt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alvarez, J.; Hamplova, J.; Hohaus, A.; Morano, I.; Haase, H.; Vassort, G. (2004). "Calcium current in rat cardiomyocytes is modulated by the carboxyl-terminal ahnak domain." J Biol Chem **279**(13): 12456-61.
- Behlke, J.; Ristau, O. (1997). "Molecular mass determination by sedimentation velocity experiments and direct fitting of the concentration profiles." Biophys J **72**(1): 428-34.
- Benaud, C.; Gentil, B.J.; Assard, N.; Court, M.; Garin, J.; Delphin, C.; Baudier, J. (2004). "AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture." J Cell Biol **164**(1): 133-44.
- Bers, D.M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." Nature **415**(6868): 198-205.
- Borgonovo, B.; Cocucci, E.; Racchetti, G.; Podini, P.; Bachi, A.; Meldolesi, J. (2002). "Regulated exocytosis: a novel, widely expressed system." Nat Cell Biol **4**(12): 955-62.
- Brenner, B. (1988). "Effect of Ca<sup>2+</sup> on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(9): 3265-9.
- Budowle, B.; Chakraborty, R.; Giusti, A.M.; Eisenberg, A.J.; Allen, R.C. (1991). "Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE." Am J Hum Genet **48**(1): 137-44.
- Catterall, W.A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 521-55.
- Chen, Y.H.; Li, M.H.; Zhang, Y.; He, L.L.; Yamada, Y.; Fitzmaurice, A.; Shen, Y.; Zhang, H.; Tong, L.; Yang, J. (2004). "Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels." Nature **429**(6992): 675-80.
- Chien, A.J.; Gao, T.; Perez-Reyes, E.; Hosey, M.M. (1998). "Membrane targeting of L-type calcium channels. Role of palmitoylation in the subcellular localization of the beta2a subunit." J Biol Chem **273**(36): 23590-7.

- Cuda, G.; Fananapazir, L.; Zhu, W.S.; Sellers, J.R.; Epstein, N.D. (1993). "Skeletal muscle expression and abnormal function of beta-myosin in hypertrophic cardiomyopathy." J Clin Invest **91**(6): 2861-5.
- Dantzig, J.A.; Goldman, Y.E.; Millar, N.C.; Lacktis, J.; Homsher, E. (1992). "Reversal of the cross-bridge force-generating transition by photogeneration of phosphate in rabbit psoas muscle fibres." J Physiol **451**: 247-78.
- De Seranno, S.; Benaud, C.; Assard, N.; Khediri, S.; Gerke, V.; Baudier, J.; Delphin, C. (2006). "Identification of an AHNAK binding motif specific for the Annexin2/S100A10 tetramer." J Biol Chem **281**(46): 35030-8.
- De Waard, M.; Pragnell, M.; Campbell, K.P. (1994). "Ca<sup>2+</sup> channel regulation by a conserved beta subunit domain." Neuron **13**(2): 495-503.
- De Waard, M.; Scott, V.E.; Pragnell, M.; Campbell, K.P. (1996). "Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels." FEBS Lett **380**(3): 272-6.
- Dolphin, A.C. (2003). "Beta subunits of voltage-gated calcium channels." J Bioenerg Biomembr **35**(6): 599-620.
- Erdmann, J.; Shimron-Abarbanell, D.; Rietschel, M.; Albus, M.; Maier, W.; Korner, J.; Bondy, B.; Chen, K.; Shih, J.C.; Knapp, M.; Propping, P.; Nothen, M.M. (1996). "Systematic screening for mutations in the human serotonin-2A (5-HT<sub>2A</sub>) receptor gene: identification of two naturally occurring receptor variants and association analysis in schizophrenia." Hum Genet **97**(5): 614-9.
- Ertel, E.A.; Campbell, K.P.; Harpold, M.M.; Hofmann, F.; Mori, Y.; Perez-Reyes, E.; Schwartz, A.; Snutch, T.P.; Tanabe, T.; Birnbaumer, L.; Tsien, R.W.; Catterall, W.A. (2000). "Nomenclature of voltage-gated calcium channels." Neuron **25**(3): 533-5.
- Foell, J.D.; Balijepalli, R.C.; Delisle, B.P.; Yunker, A.M.; Robia, S.L.; Walker, J.W.; McEnery, M.W.; January, C.T.; Kamp, T.J. (2004). "Molecular heterogeneity of calcium channel beta-subunits in canine and human heart: evidence for differential subcellular localization." Physiol Genomics **17**(2): 183-200.

- Frey, N.; Olson, E.N. (2000). "Making matters worse for a broken heart." J Clin Invest **106**(12): 1437-9.
- Gao, T.; Chien, A.J.; Hosey, M.M. (1999). "Complexes of the alpha1C and beta subunits generate the necessary signal for membrane targeting of class C L-type calcium channels." J Biol Chem **274**(4): 2137-44.
- Geeves, M.A.; Holmes, K.C. (1999). "Structural mechanism of muscle contraction." Annu Rev Biochem **68**: 687-728.
- Geisterfer-Lowrance, A.A.; Christe, M.; Conner, D.A.; Ingwall, J.S.; Schoen, F.J.; Seidman, C.E.; Seidman, J.G. (1996). "A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy." Science **272**(5262): 731-4.
- Gentil, B.J.; Delphin, C.; Benaud, C.; Baudier, J. (2003). "Expression of the giant protein AHNAK (desmoyokin) in muscle and lining epithelial cells." J Histochem Cytochem **51**(3): 339-48.
- Gentil, B.J.; Delphin, C.; Mbele, G.O.; Deloulme, J.C.; Ferro, M.; Garin, J.; Baudier, J. (2001). "The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium- and zinc-binding S100B protein: potential implications for Ca<sup>2+</sup> homeostasis regulation by S100B." J Biol Chem **276**(26): 23253-61.
- Gerster, U.; Neuhuber, B.; Groschner, K.; Striessnig, J.; Flucher, B.E. (1999). "Current modulation and membrane targeting of the calcium channel alpha1C subunit are independent functions of the beta subunit." J Physiol **517** ( Pt 2): 353-68.
- Goldman, Y.E. (1998). "Wag the tail: structural dynamics of actomyosin." Cell **93**(1): 1-4.
- Gordon, A.M.; Regnier, M.; Homsher, E. (2001). "Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin 'rocks and rolls'." News Physiol Sci **16**: 49-55.
- Gregorio, C.C.; Antin, P.B. (2000). "To the heart of myofibril assembly." Trends Cell Biol **10**(9): 355-62.
- Haase, H. (2007). "Ahnak, a new player in beta-adrenergic regulation of the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel." Cardiovasc Res **73**(1): 19-25.

- Haase, H.; Pagel, I.; Khalina, Y.; Zacharzowsky, U.; Person, V.; Lutsch, G.; Petzhold, D.; Kott, M.; Schaper, J.; Morano, I. (2004). "The carboxyl-terminal ahnak domain induces actin bundling and stabilizes muscle contraction." Faseb J **18**(7): 839-41.
- Haase, H.; Pfitzmaier, B.; McEnery, M.W.; Morano, I. (2000). "Expression of Ca(2+) channel subunits during cardiac ontogeny in mice and rats: identification of fetal alpha(1C) and beta subunit isoforms." J Cell Biochem **76**(4): 695-703.
- Haase, H.; Podzuweit, T.; Lutsch, G.; Hohaus, A.; Kostka, S.; Lindschau, C.; Kott, M.; Kraft, R.; Morano, I. (1999). "Signaling from beta-adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK." Faseb J **13**(15): 2161-72.
- Hanlon, M.R.; Berrow, N.S.; Dolphin, A.C.; Wallace, B.A. (1999). "Modelling of a voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit as a basis for understanding its functional properties." FEBS Lett **445**(2-3): 366-70.
- Hashimoto, T.; Amagai, M.; Parry, D.A.; Dixon, T.W.; Tsukita, S.; Miki, K.; Sakai, K.; Inokuchi, Y.; Kudoh, J.; et al. (1993). "Desmoyokin, a 680 kDa keratinocyte plasma membrane-associated protein, is homologous to the protein encoded by human gene AHNAK." J Cell Sci **105** ( Pt 2): 275-86.
- Hashimoto, T.; Gamou, S.; Shimizu, N.; Kitajima, Y.; Nishikawa, T. (1995). "Regulation of translocation of the desmoyokin/AHNAK protein to the plasma membrane in keratinocytes by protein kinase C." Exp Cell Res **217**(2): 258-66.
- Hess, P.; Lansman, J.B.; Tsien, R.W. (1984). "Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists." Nature **311**(5986): 538-44.
- Hieda, Y.; Tsukita, S. (1989). "A new high molecular mass protein showing unique localization in desmosomal plaque." J Cell Biol **109**(4 Pt 1): 1511-8.
- Hofmann, F.; Lacinova, L.; Klugbauer, N. (1999). "Voltage-dependent calcium channels: from structure to function." Rev Physiol Biochem Pharmacol **139**: 33-87.



- Hohaus, A.; Person, V.; Behlke, J.; Schaper, J.; Morano, I.; Haase, H. (2002). "The carboxyl-terminal region of ahnak provides a link between cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and the actin-based cytoskeleton." Faseb J **16**(10): 1205-16.
- Hosey, M.; Chien, A.; Puri, T. (1996). "Structure and Regulation of L-Type Calcium Channels." Trends Cardiovasc. Med. **6**: 265-273.
- Hoskins, R.; Hajnal, A.F.; Harp, S.A.; Kim, S.K. (1996). "The C. elegans vulval induction gene lin-2 encodes a member of the MAGUK family of cell junction proteins." Development **122**(1): 97-111.
- Huang, Y.; Laval, S.H.; van Remoortere, A.; Baudier, J.; Benaud, C.; Anderson, L.V.; Straub, V.; Deelder, A.; Frants, R.R.; den Dunnen, J.T.; Bushby, K.; van der Maarel, S.M. (2006). "AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration." Faseb J.
- Huxley, A.F. (1959). "Ion movements during nerve activity." Ann N Y Acad Sci **81**: 221-46.
- Keef, K.D.; Hume, J.R.; Zhong, J. (2001). "Regulation of cardiac and smooth muscle  $\text{Ca}^{2+}$  channels ( $\text{Ca}_v1.2a,b$ ) by protein kinases." Am J Physiol Cell Physiol **281**(6): C1743-56.
- Kingsley, P.D.; McGrath, K.E.; Maltby, K.M.; Koniski, A.D.; Ramchandran, R.; Palis, J. (2001). "Subtractive hybridization reveals tissue-specific expression of ahnak during embryonic development." Dev Growth Differ **43**(2): 133-43.
- Klugbauer, N.; Lacinova, L.; Marais, E.; Hobom, M.; Hofmann, F. (1999). "Molecular diversity of the calcium channel  $\alpha_2\delta$  subunit." J Neurosci **19**(2): 684-91.
- Komuro, A.; Masuda, Y.; Kobayashi, K.; Babbitt, R.; Gunel, M.; Flavell, R.A.; Marchesi, V.T. (2004). "The AHNAKs are a class of giant propeller-like proteins that associate with calcium channel proteins of cardiomyocytes and other cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4053-8.

- Kouno, M.; Kondoh, G.; Horie, K.; Komazawa, N.; Ishii, N.; Takahashi, Y.; Takeda, J.; Hashimoto, T. (2004). "Ahnak/Desmoyokin is dispensable for proliferation, differentiation, and maintenance of integrity in mouse epidermis." J Invest Dermatol **123**(4): 700-7.
- Kudoh, J.; Wang, Y.; Minoshima, S.; Hashimoto, T.; Amagai, M.; Nishikawa, T.; Shtivelman, E.; Bishop, J.M.; Shimizu, N. (1995). "Localization of the human AHNAK/desmoyokin gene (AHNAK) to chromosome band 11q12 by somatic cell hybrid analysis and fluorescence in situ hybridization." Cytogenet Cell Genet **70**(3-4): 218-20.
- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. (2001). "Molecular Cell Biology." Media Connected, **fourth edition**.
- Masunaga, T.; Shimizu, H.; Ishiko, A.; Fujiwara, T.; Hashimoto, T.; Nishikawa, T. (1995). "Desmoyokin/AHNAK protein localizes to the non-desmosomal keratinocyte cell surface of human epidermis." J Invest Dermatol **104**(6): 941-5.
- McGee, A.W.; Nunziato, D.A.; Maltez, J.M.; Prehoda, K.E.; Pitt, G.S.; Bredt, D.S. (2004). "Calcium channel function regulated by the SH3-GK module in beta subunits." Neuron **42**(1): 89-99.
- Mullis, K.B.; Faloona, F.A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Nie, Z.; Ning, W.; Amagai, M.; Hashimoto, T. (2000). "C-Terminus of desmoyokin/AHNAK protein is responsible for its translocation between the nucleus and cytoplasm." J Invest Dermatol **114**(5): 1044-9.
- Petzhold, D.; Bader, M.; Bartsch, H.; Hohaus, A.; Morano, I.; Haase, H. (2003). Mouse ahnak homologues to human ahnak, NCBI Data base. **AY367634**.
- Pragnell, M.; De Waard, M.; Mori, Y.; Tanabe, T.; Snutch, T.P.; Campbell, K.P. (1994). "Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit." Nature **368**(6466): 67-70.

- Rehm, H. (2002). Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 4. Auflage.
- Ringer, S. (1883). "A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart." Journal of Physiology **4**: 29-47.
- Robbins, J. (2000). "Remodeling the cardiac sarcomere using transgenesis." Annu Rev Physiol **62**: 261-87.
- Rubart, M.; Zipes, D.P. (2005). "Mechanisms of sudden cardiac death." J Clin Invest **115**(9): 2305-15.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition.
- Schiaffino, S.; Reggiani, C. (1996). "Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance." Physiol Rev **76**(2): 371-423.
- Schulz, K. (1995). "Mechanische und pharmakologische Belastungstests am isolierten "Working Heart". " Biomesstechnik-Verlag March GmbH, Deutschland **9**: 49-58.
- Shtivelman, E.; Bishop, J.M. (1993). "The human gene AHNAK encodes a large phosphoprotein located primarily in the nucleus." J Cell Biol **120**(3): 625-30.
- Shtivelman, E.; Cohen, F.E.; Bishop, J.M. (1992). "A human gene (AHNAK) encoding an unusually large protein with a 1.2-microns polyionic rod structure." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5472-6.
- Solaro, R.J.; Van Eyk, J. (1996). "Altered interactions among thin filament proteins modulate cardiac function." J Mol Cell Cardiol **28**(2): 217-30.
- Stones, R.; Billeter, R.; Harrison, S.; White, E. (2005). "Heterogenic contractile response of rat left ventricular myocytes to beta1-adrenoceptor stimulation." Eur J Pharmacol **512**(2-3): 117-20.
- Striessnig, J. (1999). "Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels." Cell Physiol Biochem **9**(4-5): 242-69.

- Sussman, J.; Stokoe, D.; Ossina, N.; Shtivelman, E. (2001). "Protein kinase B phosphorylates AHNAK and regulates its subcellular localization." J Cell Biol **154**(5): 1019-30.
- Thomas, K.R.; Capecchi, M.R. (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." Cell **51**(3): 503-12.
- Vibert, P.; Craig, R.; Lehman, W. (1997). "Steric-model for activation of muscle thin filaments." J Mol Biol **266**(1): 8-14.
- Walther, T.; Balschun, D.; Voigt, J.P.; Fink, H.; Zuschratter, W.; Birchmeier, C.; Ganten, D.; Bader, M. (1998). "Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene." J Biol Chem **273**(19): 11867-73.
- Wernyj, R.P.; Ewing, C.M.; Isaacs, W.B. (2001). "Multiple antibodies to titin immunoreact with AHNAK and localize to the mitotic spindle machinery." Cell Motil Cytoskeleton **50**(2): 101-13.
- Yue, D.T.; Herzig, S.; Marban, E. (1990). "Beta-adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(2): 753-7.
- Zarrinpar, A.; Bhattacharyya, R.P.; Lim, W.A. (2003). "The structure and function of proline recognition domains." Sci STKE **2003**(179): RE8.

## 7. Anhang

## 7.1 Gen-Bibliotheken-Pool

LIB.: RPCIP711				USER: Dr. Bader				REQ.: 1769				
POOLS: PP1-PP84								PLATE: 1				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PP1	PP9	PP17	PP25	PP33	PP41	PP49	PP57	PP65	PP73	PP81	
B	PP2	PP10	PP18	PP26	PP34	PP42	PP50	PP58	PP66	PP74	PP82	
C	PP3	PP11	PP19	PP27	PP35	PP43	PP51	PP59	PP67	PP75	PP83	
D	PP4	PP12	PP20	PP28	PP36	PP44	PP52	PP60	PP68	PP76	PP84	
E	PP5	PP13	PP21	PP29	PP37	PP45	PP53	PP61	PP69	PP77		
F	PP6	PP14	PP22	PP30	PP38	PP46	PP54	PP62	PP70	X PP78		
G	PP7	PP15	PP23	PP31	PP39	PP47	PP55	PP63	PP71	PP79		
H	PP8	X PP16	X PP24	PP32	PP40	PP48	PP56	PP64	PP72	PP80		

Abb. 7.1: Erster Gen-Bibliotheken-Pool (Library RPCI21 Mouse Pac, Library No: 711). Die Klonen PP1-PP84 sind in der ELISA-Platte eingetragen. Die positiv identifizierten Klone: RPCIP711PP16, RPCIP711PP24 und RPCIP711PP78 werden angekreuzt.

LIB.: RPCIP711						USER: Dr.Bader						REQ.: 1783					
POOLS.: PP16, PP24												PLATE: 1					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
A	p121	PP16-1	PP16-9	PP16-17	PP16-25	PP16-33	p185	PP24-1	PP24-9	PP24-17	PP24-25	PP24-33	A				
B	p122	PP16-2	PP16-10	PP16-18	PP16-26	PP16-34	p186	PP24-2	PP24-10	PP24-18	PP24-26	PP24-34	B				
C	p123	PP16-3	PP16-11	PP16-19	PP16-27	PP16-35	p187	PP24-3	PP24-11	PP24-19	PP24-27	PP24-35	C				
D	p124	PP16-4	PP16-12	PP16-20	PP16-28	PP16-36	p188	PP24-4	PP24-12	PP24-20	PP24-28	PP24-36	D				
E	p125	PP16-5	PP16-13	PP16-21	PP16-29	PP16-37	<del>p189</del>	PP24-5	PP24-13	PP24-21	<del>PP24-29</del>	PP24-37	E				
F	p126	PP16-6	PP16-14	PP16-22	PP16-30	PP16-38	p190	PP24-6	PP24-14	PP24-22	PP24-30	PP24-38	F				
G	<del>p127</del>	PP16-7	<del>PP16-15</del>	PP16-23	PP16-31	PP16-39	p191	PP24-7	PP24-15	PP24-23	PP24-31	PP24-39	G				
H	p128	PP16-8	PP16-16	PP16-24	PP16-32	PP16-40	p192	<del>PP24-8</del>	PP24-16	PP24-24	PP24-32	PP24-40	H				

Abb. 7.2: Erster Teil des zweiten Gen-Bibliotheken-Pools (Library RPCI21 Mouse Pac, Library No: 711). Die Einzelklone für PP16 sind in den Spalten 1-6 und in den Zeilen A-H; die Einzelklone für PP24 sind in den Spalten 7-12 und in den Zeilen A-H eingetragen. Die drei positiv identifizierten Klone für PP16 (P127, PP16-15 und PP16-38) und für PP24 (P189, PP24-8 und PP24-29) wurden angekreuzt.

LIB.: RPCIP711			USER: Dr.Bader			REQ.: 1783						
POOLS.: PP78						PLATE: 2						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	p617	<del>PP78-1</del>	PP78-9	PP78-17	PP78-25	PP78-33						
B	p618	PP78-2	PP78-10	PP78-18	PP78-26	PP78-34						
C	p619	PP78-3	PP78-11	PP78-19	PP78-27	PP78-35						
D	p620	PP78-4	PP78-12	PP78-20	PP78-28	PP78-36						
E	p621	PP78-5	PP78-13	PP78-21	<del>PP78-29</del>	PP78-37						
F	p622	PP78-6	PP78-14	PP78-22	PP78-30	PP78-38						
G	p623	PP78-7	PP78-15	PP78-23	PP78-31	PP78-39						
H	<del>p624</del>	PP78-8	PP78-16	PP78-24	PP78-32	PP78-40						

Abb. 7.3: Zweiter Teil des zweiten Gen-Bibliotheken-Pools (Library RPCI21 Mouse Pac, Library No: 711). Die Einzelklone für PP78 sind in den Spalten 1-6 und in den Zeilen A-H eingetragen. Die drei positiv identifizierten Klone für PP78 (P624, PP78-1 und PP78-29) wurden angekreuzt.

## 7.2 Expressionsvektoren

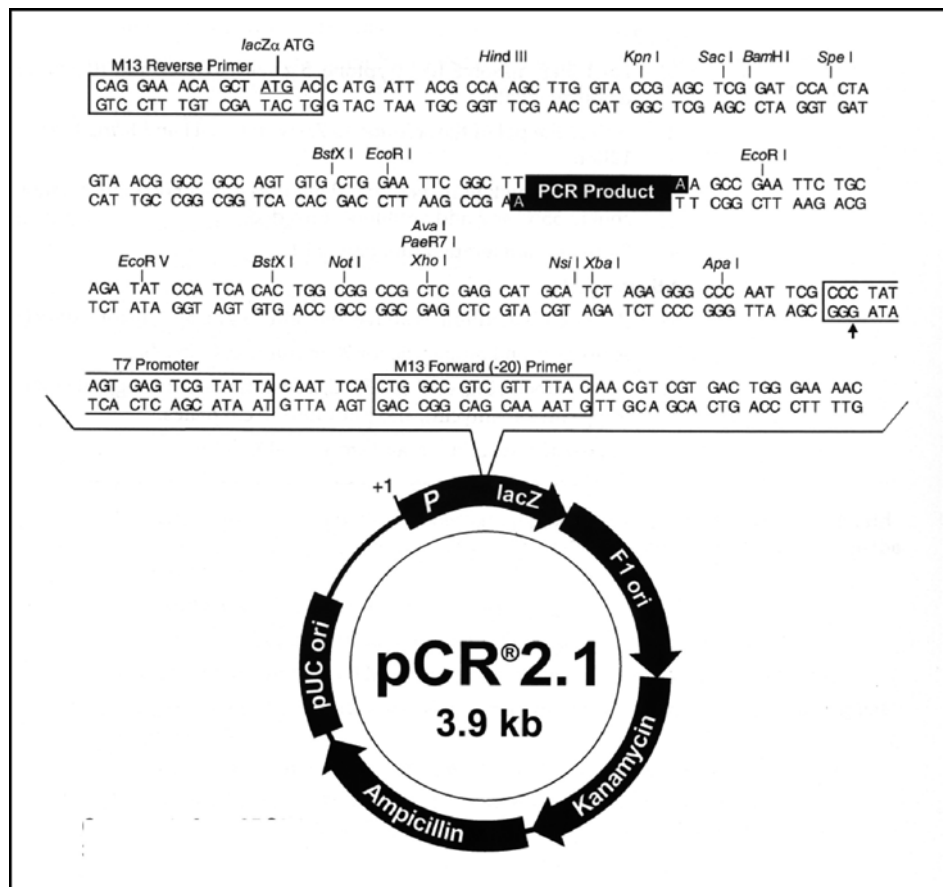


Abb. 7.4: Vektor-Karte des pCR 2.1-Vektors mit der Multiple-Cloning-Site von der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland.



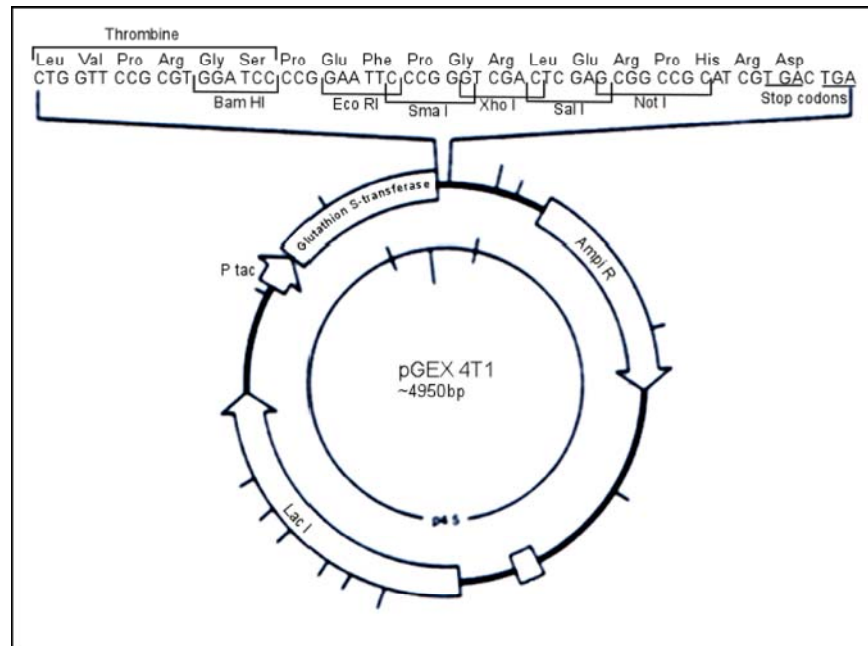


Abb. 7.5: Vektor-Karte des GST-Expressionsvektors pGEX 4T1 mit der Multiple-Cloning-Site von der Firma Amersham, Pharmacia, Deutschland.

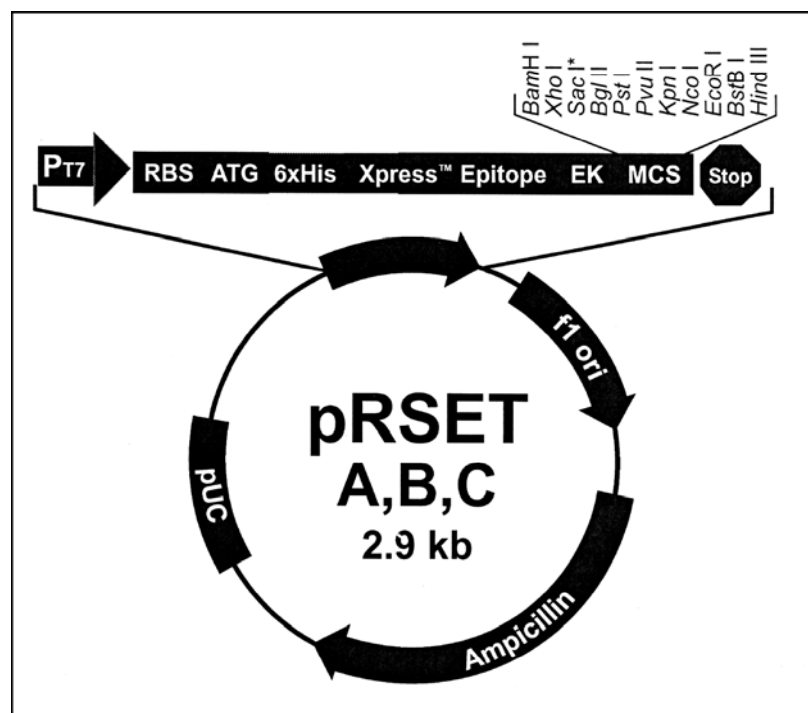


Abb. 7.6: Vektor-Karte des His-Tag-Expressionsvektors pRSET A mit der Multiple-Cloning-Site von der Firma Invitrogen GmbH.

### 7.3 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Mouse:	1	GLDLGGKGGIRVPGVDVSSSLGAGSVEVQAPSLQSGDIGKIKIPTMKVPKFGVSAGLDGQ	60
Human:	17	.....RG..VQ..A..I.....GRA....G...E...H...F.....T.RE..	76
Mouse:	61	IPEVGLSVSAPESSVGHKGDKPGLAIGGNIQAPHLEVPSSVNIEGLEGLKGPQITGPS	120
Human:	77	T.KA..R.....V.....G....T.----...Q...SVP.A.....	132
Mouse:	121	LEGDGLGKGTKLQGNIGMDACASKIEGSITGPSVEIGTPDQDVHGLGGKLNMPKMKVPKF	180
Human:	133	.....A.P..H..V..S.PQ.G.....VQA..I..Q.P.S...V.....	192
Mouse:	181	SASGSKGEGIGLDVALPTGEVTLPGVSGDVSLPEIATGGLEGKMKGAKVKTPEMIIQPKP	240
Human:	193	.V..A...ET.I..T.....V.....T.....	252
Mouse:	241	ISMQDVDSLGLSCKLKGN <b>MKT</b> SAPEVKGDVKGPMQMAVKGSRVDIETPNLEGLTGPKISS	300
Human:	253	.....P.... <b>DIKV</b> ...G.Q.....V.L.....RLG.	312
Mouse:	301	-----	
Human:	313	-----	
Mouse:	1469	-----DVGDDIDIECPEGKLG <b>GPK</b> FKMPDMHFKTPKISMPDIDLNLGPKVKGDVDVSLPK	1526
Human:	1573	PFVEAE.P.V.L...DA.....E....A.....V..H.....A...V..	1632
Mouse:	1527	VEGEIKVPEVDIKGPKVDIDVPDV--HG-----PDWHLKMPKIKMPKFSM----PGFKGE	1577
Human:	1633	L..DLTG.S.GVEV.D.ELEC..AKLK.PKFKM..M.FKA...S..DVDLHLKG.KV..-	1691
Mouse:	1578	GPEVDVSLPNADLDVSGPKVDIDVPDVNIEGPDALKGPKFKMPEMNIKAPKISMP--DL	1635
Human:	1692	-D.....V.KLEG.LT..S.GVE....E..C.....HF.T.....DV..	1749
Mouse:	1636	HLKGPKVKGDVDVSLPKVEGDLKGPVDIDKGPDKMDINAPDMQVQPDWHLKMPKVKMPKF	1695
Human:	1750	.....M...V.....EM.V.....D...V..H.....M.....	1809
Mouse:	1696	SMPGFKGEGPEVDVNLPAKADLDVSGPKVDIDVPDVNVEGPDMDKVKGPKFRMPEINIKAPK	1755
Human:	1810	.....A.....VV.....VE....SL...EG.L....LK...MHF....	1869
Mouse:	1756	ISMVDVLELKGPKVKGAFDGSVPKIEGTLKGPEIDMKGPGLDFEGPDALKSGPNLKMP	1815
Human:	1870	.....H.....DV.V.L..L..D.T..SV.VEV.DVEL.C.....K..KF...E	1929

## 7. Anhang

---

Mouse:	1816	LEVSVPKITGPDANVHLKTPKV----GISAPKLG-----GEVDLKGPVKVDLETPSLDV--	1865
Human:	1930	MHFKT...SM..V.LN..G...KGDMDV.V..VE.EMKVPD..IR.....IDA.DV..HG	1989
Mouse:	1866	---HMESPDINIEGPDVKVPKFKKPKFGFGAKSPKADIKTPTVDVTVPEAELNVDSPEIN	1922
Human:	1990	PDW.LKM.KMKMPKFSMPGF.GEG.EVDVNLPKADV.VSG.K...E..DVS.--EG..-	2045
Mouse:	1923	IGGKSKKSKFKMPKIHMSGPKVKAKKQGFDLNIP--GGEIDTS-----LKAPDVDVSV	1973
Human:	2046	--..L.GP.....EM.FKT..ISMPDVD.N.KG.KIK.DVDV.APKLEGE..G.EL..KG	2103
Mouse:	1974	AGPDAAL-----KAEVKSPKVKKT----MFGKMYFPDVEFDIKSPKFKAEAPLPSPK	2021
Human:	2104	PKL..DMPEVAVEGPNKGW.TP.F.MPDMHFKAP.ISM..LDLHL....A.G.VDVDV..	2163
Mouse:	2022	LEGEIKVPDVDISSPGINVEAPDIHMKAPKFKVPDV-----EASGPKIEGNLKGPK----	2072
Human:	2164	...DL.G.H..V.G.D.DI.G.EGKL.G....M..MHFKAPNI.M.DVDL.....IKGD	2223
Mouse:	2073	-----VQANLDTPDINIEGPEAKIKAPSL	2096
Human:	2224	VDVSVPE.EGK.EV..M..R..KVDVN..DV	2254

Abb. 7.7: Die Aminosäuresequenz von Ahnak (Maus), abgeleitet aus der genomischen DNA. Die durch PCR- und Gen-Bibliotheken-Screening (Library RPCI21 Mouse PAC) erhaltenen Sequenzen sind im Vergleich zur humanen Ahnak-Sequenz dargestellt. Die fett gedruckten Buchstaben zeigen den Beginn und das Ende der bereits bekannten partiellen Desmoyokin/Ahnak-Sequenz der Maus, die unter EMBL/GenBank/ DDBJ-Accessionnummer: X65157 (Hashimoto, 1993) zugänglich ist. Die bereits bekannte Sequenz (AS 301-1468) ist nicht gezeigt. Die, im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit, aufgeklärte Gensequenz wurde unter: NCBI Data base, Accessionnummer AY AY367634, veröffentlicht (Petzhold, 2003).

## 7. Anhang

ATCGATGCGG	CCGCAGGCCT	CTCTAGAGGT	ACAGGCCCA	TCCCTCCAGA	GTGGTGATAT	60
<u>ClaI</u>	<u>NotI</u>	<u>XbaI</u>	<u>Primer A<sub>1</sub> fw→</u>			
TGGGAAAATT	AAAATTCCTA	CCATGAAGGT	GCCAAAATTT	GGTGTCTCCG	CAGGTCTGGA	120
TGGCCAGATT	CCAGAGGTAG	GGCTGAGTGT	TTCTGCACCT	GAATCCTCTG	TGGGACACAA	180
GGGTGACAAG	CCAGGCTTGG	CTATTGGGGG	AAACATCCAG	GCTCCTCACC	TGGAAGTAAA	240
TCCCTCCTCT	GTCAATATTG	AGGGGCTTGA	GGGGAACTG	AAGGGTCCCC	AGATCACTGG	300
GCCATCACTT	GAAGGTGACT	TAGGCCTGAA	AGGTACCAAG	CTGCAAGGGA	ACATAGGAAT	360
GGATGCCTGT	GCTTCCAAAA	TCGAGGGCAG	CATCACTGGT	CCTAGTGTGG	AAATCGGAAC	420
CCCTGATGTT	GATGTTTCATG	GGCTAGGGGG	CAAACCTGAAT	ATGCCCAAGA	TGAAAGTCCC	480
TAAGTTCTCT	GCATCAGGTT	CAGAGGGAGA	GGGGATTGGC	CTTGATGTGG	CACTGCCCCAC	540
AGGTGAAGTG	ACCCTTCCTG	GGGTCTCTGG	GGATGTAAGT	CTGCCTGAGA	TTGCTACTGG	600
TGGGCTCGAA	GGGAAGATGA	AGGGTGCTAA	AGTCAAGACT	CCTGAAATGA	TGATCCGAAA	660
ACCTAAAATC	TCCATGCAGG	ATGTGGATCT	GAGCCTGGGG	TCCTGTAAAC	TGAAAGGAAA	720
TATGAAGACA	TCTGCTCCTG	AGGTGAAAGG	TGATGTTAAA	GGCCCTCAGA	TGGCAGTTAA	780
AGGCTCCAGA	GTGGACATAG	AGACGCCAAA	CTTAGAGGGG	ACCTTGACAG	GTCCCAAGAT	840
CAGCAGCCCT	TCTGGAAAAA	TAGGGGCCTG	TAGGATTTCT	ATGGCAGATG	TAGACTTAAA	900
TGTAGCTGCA	CCTAAAGGGA	AAGGGGGTGT	AGATGTCATT	CTCCCCAATG	TAGAAGGAAA	960
AGCCAAAGGT	CTTGAAGTTG	ATGTCAAAGG	CCCCAAAATG	GACATCAGTG	CTCCAGATGT	1020
				<u>←Primer Bx rev</u>		
CTCGAGCAGT	GTGGTTTTTG	AAGAGGAAGC	AAAAAGCCTC	TCCACCCAGG	CCTGGAATGT	1080
<u>XhoI</u>	Start der Neomycin-Resistenz-Kassette					
TTCCACCCAA	TGTCGAGCAG	TGTGGTTTTG	CAAGAGGAAG	CAAAAAGCCT	CTCCACCCAG	1140
GCCTGGAATG	TTTCCACCCA	ATGTCGAGCA	AACCCCGCCC	AGCGTCTTGT	CATTGGCGAA	1200
TTCGAACACG	CAGATGCAGT	CGGGGCGGCG	CGGTCCCAGG	TCCACTTCGC	ATATTAAGGT	1260
GACGCGTGTG	GCCTCGAACA	CCGAGCGACC	CTGCAGCCAA	TATGGGATCG	GCCATTGAAC	1320
AAGATGGATT	GCACGCAGGT	TCTCCGGCCG	CTTGGGTGGA	GAGGCTATTC	GGCTATGACT	1380
				<u>←Primer Neo 1L rev</u>		
GGGCACAACA	GACAATCGGC	TGCTCTGATG	CCGCCGTGTT	CCGGCTGTCA	GCGCAGGGGC	1440
GCCCGGTTCT	TTTTGTCAAG	ACCGACCTGT	CCGGTGCCCT	GAATGAACTG	CAGGACGAGG	1500
CAGCGCGGCT	ATCGTGGCTG	GCCACGACGG	GCGTTCCTTG	CGCAGCTGTG	CTCGACGTTG	1560
TCACTGAAGC	GGGAAGGGAC	TGGCTGCTAT	TGGGCGAAGT	GCCGGGGCAG	GATCTCCTGT	1620
CATCTCACCT	TGCTCCTGCC	GAGAAAGTAT	CCATCATGGC	TGATGCAATG	CGGCGGCTGC	1680
ATACGCTTGA	TCCGGCTACC	TGCCCATTCT	ACCACCAAGC	GAAACATCGC	ATCGAGCGAG	1740
CACGTACTCG	GATGGAAGCC	GGTCTTGTCT	ATCAGGATGA	TCTGGACGAA	GAGCATCAGG	1800
GGCTCGCGCC	AGCCGAACCT	TTCGCCAGGC	TCAAGGCGCG	CATGCCCGAC	GCGCAGGATC	1860
TCGTCGTGAC	CCATGGCGAT	GCCTGCTTGC	CGAATATCAT	GGTGGAATAA	GGCCGCTTTT	1920
CTGGATTTCAT	CGACTGTGGC	CGGCTGGGTG	TGGCGGACCG	CTATCAGGAC	ATAGCGTTGG	1980
CTACCCGTGA	TATTGCTGAA	GAGCTTGGCG	GCGAATGGGC	TGACCGCTTC	CTCGTGCTTT	2040
ACGGTATCGC	CGCTCCCGAT	TCGCAGCGCA	TCGCCTTCTA	TCGCCTTCTT	GACGAGTTCT	2100
TCTGAGGGGA	TCGGCAATAA	AAAGACAGAA	TAAAACGCAC	GGGTGTTGGG	TCGTTTGTTC	2160
				Ende der Neomyzinkassette		
GGATCCCGTT	AACAATTCGG	CTTCCAGAAT	GGAATTTGAA	GATGCCCAAG	TTACGCGTCC	2220
<u>BamHI</u>	<u>HpaI</u>	<u>P<sub>7</sub>opt fw →</u>				
CAGGAGTCAA	AGGAGAAGGC	CTAGATGTAA	ATGTTACTCT	GCCCGAAGGA	GATATTAGTA	2280
TTTCGGGGCC	TAAGGTCAAT	GTAGAAGCTC	CAAACGTCAA	CATGGAGGGT	CTGGGTTGCA	2340
AACTTAAAGG	CCCTGACATT	AATCTTCCTG	AAGTAAAGTGT	CAAGACTCCA	AAGATTTCTA	2400
TGCCTGATGT	GGATCTGCAT	ATCAAAGGGC	CAAAGGTGAA	GGGAGCGTAT	GAAAGTAACAC	2460
CACCAAAGCT	TGAGGGGGAA	CTGAAAGGCT	CCAAAGTGGA	CATTGACACG	CGACAAGTGG	2520
ATGTTTCATGG	CCCAGACCTG	AAGATTCCCA	AGATGAAAAT	GCCCAAATTC	AGTGTGCCAG	2580
GGTTCAAAGC	AGAGGGCCCA	GAAGTGGATG	TGAACCTGCC	CAAGGCTGAC	CTTGACATTT	2640
CTGGGACTAA	GGTGGAAGTC	AGTGCTCCAG	ATGTGAGCAT	TGAAGGCTCA	GAAGGGAAGT	2700
TGAAAGGGCA	TAAGTTTAAA	ATGCCTGAAA	TGAATATCAG	AGCTCCAAAG	ATCTCCATGC	2760
			<u>SacI</u>			
CAGATGTGGA	CTTACACTTA	AAAGGCCCCA	ATGTAAAGGG	AGCATATGAT	GTCACAGTGC	2820
CAAGGGCAGA	AGGTGAGATT	AAAGTTCCTG	ATGTTGAACT	TAAAAGTGCT	AAACTGGACA	2880
TTGATGTTCC	AAATGTGGAT	GTTCAAGGTC	CTGAATTGCA	TATGAAGATG	CCCAAGATAA	2940
AAATCCCCAA	GTTTGGCATG	CCAGGCTTCA	AGGCAGAGAG	CCCAGAAATG	GAGGTGAATC	3000
TCCCAAAGTC	TGACATTGAT	GTCTCAGGAC	CCAATGTGGA	TGTCAAAGTT	CCAGATGTGA	3060
ACATTGAAGG	ACCTGAAGGA	AAGCTGAAGG	GTCCTAAGCT	GAAGATGCCT	GAGATGAATA	3120
TCAAGGCCCC	AAAGATATCC	ATGCCTGATG	TGGATTTGCA	TATGAAAGGC	CCCAAAGTTA	3180

AAGGAGCATA	TGATGTCACA	ATGCCAAAGC	TGGAAGGAGA	TTTGAAAGGC	CCCAATGTAG	3240
ATGCTAGTGT	TCCAGATGTT	GATGTTTCATG	GTCCCGACTG	GAACCTTGAAA	ATGCCAAAAGA	3300
TTCCCCCTGCC	CAAATTCAGC	ATGCCTAGTC	TCAAAGGTGA	AGGCCCAGAG	TTGGATGTGA	3360
ACATGCCCAA	GGCTGATGTG	GACATTTCTG	TACCAAAGCT	AGATATTAGT	GCACCAGATC	3420
TGAACCTTGA	GGGACCAGAA	GGGAAGTTGA	AAGGAACCAA	ATTTAAGATG	CCTGAGATGC	3480
ACTTCAAGGC	TCCAAAGGTG	TCTCTACCAG	ATGTGGATCT	GGATCTCAA	GGACCCAAAA	3540
TGAAAGGAAA	TCTGGACATG	TCTGCACCAA	AAATAGAGGG	AGAGATGAAA	GCTCCAGATG	3600
TGGACATTAA	AGGTCCAAAT	GTAGATATTA	AAGCACCAGA	AGTGGATGTG	CAAGGCCCAG	3660
AATGGAGCCT	GAAGATGCCA	AAGATGAAAA	TGCCCCAAGT	CAGTATGCCT	ACTCTCAAAG	3720
GTGAGGGTCC	AGATGTGGAT	GTGAGCTTGC	CTAAGGCTAC	TATTGATGTC	TCAGGACCTA	3780
AACTTGACAT	TGAAACCTCA	GATGTGAGCC	TTGAGGGACC	AGAAGGAAAAG	CTGAAGGGCC	3840
CCAAGTTTAA	GATGCCTGAC	ATGCACCTCA	AGGCACCCAA	GATCTCCATG	CCTGATGTGG	3900
ACTTAAACAT	GAAGGGCCCC	AAAGTCAAGG	GGGACATGGA	TGTGACAGTG	CCCAAGATAG	3960
AAGGTGAAAT	GAAAGTGCCA	GATGTGGATA	TCAAAGGCC	TAAAGTGGAC	ATCAGTGCCC	4020
CAGATGTGGA	TGTACAAGGC	CCAGACTGGC	ACCTGAAGAT	GCCCAAGATG	AAAATGCCCA	4080
AGTTCAGCAT	GCCTGGCTTC	AAAGCAGAGG	GCCCAGAAGT	GGATGTAAAT	CTGCCCAAGG	4140
CTGACATTGA	TGTCTCAGGG	CCCAAGGTGG	ACATTGATGT	TCCTGATGTG	AATATTGAAG	4200
GTCCAGATGC	AAAGCTGAAG	GGCCCCAAGT	TCAAGATGCC	TGAGATGAAC	ATCAAGGCTC	4260
CAAAGATCTC	CATGCCAGAT	TTACATCTTA	AGGGTCCCCA	AGTGAAGGGT	GATGTAGATG	4320
TTTCCCTGCC	CAAAGTGGAA	GGTGACCTCA	AAGGCCCAGA	CATTGACATC	AAAGGTCCCA	4380
AAATGGACAT	CAATGCTCCA	GATATGGACG	TGCAGGGCCC	AGACTGGCAC	CTGAAGATGC	4440
CCAAGATGAA	AATGCCCAAG	TTCAGCATGC	CTGGCTTCAA	AGCAGAGGGC	CCAGAAGTGG	4500
ATGTGAATCT	GCCCCAAGGCT	GACATTGATG	TCTCAGGGCC	CAAAGTTGAT	ATTGAGGGCC	4560
CAGATGTGAG	CATCGAGGGA	CCAGAAGGGA	AGCTGAAGGG	CCCCAAGTTT	AAGATGCCTG	4620
ACATGCACTT	CAAGGCCCCC	AAGATCTCCA	TGCCTGATGT	GGACTTGAAT	ATTAAGGGGC	4680
CCAAAGGAAA	AGCAGATGTG	GATGCATCAT	TGCCTGAGGT	AGAAGGTGGA	GTAAAGTATG	4740
CAGATGTGGA	CATTAAAGGA	CCCAAAGTTG	GCTTTGATGC	TCCAGATGTT	GAGGTTCTATG	4800
GCCCAGACTG	GCACCTTAAG	ATGCCCAAGG	TGAAAATGCC	CAAGTTTCAGC	ATGCCTGGCT	4860
TCAAAGGAGA	AGGTCCAGAA	GTAGACATCC	CCAAGGCCAA	CATTGATGTT	TCAGGACCCA	4920
AGGTAGACAT	CGATGTTCCA	GATGTAAATA	TTGAAGGTCC	AGATACAAAA	CTAAAAGGTC	4980
CAAAATTTAA	GATGCCAGAA	ATGAACATAA	AGCCTCAGAA	GATATCCATG	CCAGATGTTA	5040
GCTTGAATTT	GAAAGGCCCT	AAGGTAAAAG	CAGATTGTGA	TGTCTCAGTT	CCAAAAGTGG	5100
GAGGAGAAAT	AAAAGCTCCT	GCTGTTGACA	TCAAAGGTCC	TAAAGTAGAG	GCACCAGATG	5160
TGGAAGTTCA	TGGCCCAGAC	TGGCACCTGA	AGATGCCCAA	GGTCAAAATG	CCTAAGTTCA	5220
GCATGCCTGG	CTTCAAAGGA	GAGGGTGCAG	AAGTAGATGT	GAATCTTCAA	AAGGCCAATA	5280
TTGATGTCTC	AGGACCCAAG	GTGGACATTG	ATGTTCCAGA	TGTGAATATT	GAAGGGCCAG	5340
AAGGGAAACT	AAAGGGTCCC	AAGTTCAAGA	TGCCAAGCAT	GAATATACAG	ACACACAAAA	5400
TCTCTATGCC	TGATGTTGGG	CTTAATTTGA	AAGGACCTAA	ACTGAAAAGT	GGTGTAGATG	5460
TTTCTCTTCC	AAAAGTAGAG	GGAGAATTGA	AGGGTCCTGA	AGTTGATGTG	GATGTTGGTG	5520
ATATTGATAT	TGAATGTCCA	GAAGGGAAGC	TGAAGGGTCC	CAAGTTTAAAG	ATGCCTGACA	5580
TGCACTTCAA	GACTCCTAAG	ATCTCCATGC	CTGACATTGA	CTTAAACCTG	AAAGGCCCCA	5640
AAGTGAAGGG	TGATGTGGAT	GTGTCTCTGC	CCAAAGTGGG	AGGTGAGATT	AAAGTTCTCTG	5700
AAGTTGACAT	CAAAGGCCCC	AAAGTGGACA	TTGATGTTCC	AGATGTGGAT	GTCCATGGCC	5760
CAGATGGCA	CTGAAGATG	CCCAAATAA	AAATGCCCAA	GTTCAGCATG	CCTGGCTTCA	5820
AGGGAGAAGG	CCCTGAAGTA	GATGTGAGCC	TGCCCAATGC	TGACCTTGAT	GTTCTCAGGAC	5880
CCAAGGTGGA	CATTGATGTT	CCAGATGTGA	ATATTGAAGG	TCCAGATGCA	AAGCTGAAGG	5940
GCCCCAAGTT	CAAGATGCCT	GAGATGAACA	TCAAGGCTCC	AAAGATCTCC	ATGCCAGATT	6000
TACATCTTAA	GGGTCCCAA	GTGAAGGGTG	ATGTAGATGT	TTCCCTGCCC	AAAGTGGAAG	6060
GTGACCTCAA	AGGCCCAGAT	GTTGACATCA	AAGGTCCCAA	AATGGACATC	AATGCTCCAG	6120
ATATGGACGT	GCAGGGCCCA	GACTGGCACC	TGAAGATGCC	CAAGGTGAAA	ATGCCCAAGT	6180
TCAGCATGCC	TGGCTTCAA	GGAGAGGGCC	CAGAAGTGGA	TGTAAATCTG	CCCAAGGCTG	6240
ACCTTGATGT	TTCAGGACCC	AAGGTGGACA	TTGATGTTCC	AGATGTTAAT	GTTGAGGGTC	6300
CAGATATGAA	AGTAAAAGGT	CCCAAATTCA	GGATGCCTGA	GATTAACATC	AAGGCTCCCA	6360
AGATCTCTAT	GCCTGATGTT	GATCTGGAGT	TAAAAGGACC	CAAAGTAAAA	GGAGCCTTTG	6420
ATGGGTCTGT	CCCTAAGATT	GAAGGTACTC	TCAAAGGACC	TGAAATAGAT	ATGAAAGGTC	6480
CAGGTCTGGA	TTTTGAAGGC	CCTGATGCTA	AACCTTAGTG	GCCTAACTTG	AAGATGCCAT	6540
CGCTGGAGGT	ATCTGTTTCT	AAAATAACTG	GGCCTGATGC	TAATGTGCAC	CTTAAGACAC	6600
CGAAAGTTGG	AATTTCTGCG	CCTAAGTTAG	GAGGTGGTGA	GGTAGACCTC	AAGGGGCCCTA	6660
AAGTTGATTT	AGAAACTCCA	AGCTTAGATG	TCCACATGGA	AAGCCCTGAT	ATTAATATTG	6720
AGGGGCCGGA	TGTTAAAGTT	CCGAAATTTA	AGAAACCCAA	GTTTGGATTT	GGTGCAAAAA	6780
GCCCCAAAGC	TGACATCAAG	ACACCCACAG	TTGATGTGAC	TGTCCCTGAA	GCAGAGCTGA	6840

## 7. Anhang

<b>ATGTTGATTC</b>	<b>TCCTGAAATA</b>	<b>AACATTGGTG</b>	<b>GCAAGAGCAA</b>	<b>GAAAAGCAAG</b>	<b>TTTAAATGC</b>	6900
<b>CTAAAATTCA</b>	<b>CATGAGTGGT</b>	<b>CCTAAAGTTA</b>	<b>AAGCCAAAAA</b>	<b>ACAGGGATTT</b>	<b>GATTTGAATA</b>	6960
<b>TTCTTGGAGG</b>	<b>TGAGATTGAT</b>	<b>ACCAGTCTCA</b>	<b>AAGCTCCTGA</b>	<b>TGTAGATGTT</b>	<b>AGTGTTCAG</b>	7020
<b>GGCCTGATGC</b>	<b>TGCGCTCAAA</b>	<b>GCTGAAGTAA</b>	<b>AATCTCCCAA</b>	<b>AGTCAAGAAA</b>	<b>ACTATGTTTG</b>	7080
<b>GAAAAATGTA</b>	<b>CTTTCCAGAT</b>	<b>GTAGAATTTG</b>	<b>ACATTAAGTC</b>	<b>ACCTAAATTT</b>	<b>AAAGCAGAGG</b>	7140
<b>CTCCCCTACC</b>	<b>TAGCCCCAAG</b>	<b>CTGGAGGGTG</b>	<b>AAATCAAGGT</b>	<b>ACCAGATGTG</b>	<b>GATATTTCTT</b>	7200
<b>CACCAGGGAT</b>	<b>TAATGTGGAA</b>	<b>GCTCCTGATA</b>	<b>TTCATATGAA</b>	<b>GGCTCCCAAG</b>	<b>TTCAAGGTGC</b>	7260
<b>CAGACGTGGA</b>	<b>AGCCTCAGGG</b>	<b>CCAAAGATAG</b>	<b>AGGGCAACTT</b>	<b>GAAAGGTCCC</b>	<b>AAGGTGCAGG</b>	7320
<b>CAAAC TTGGA</b>	<b>CACACCTGAC</b>	<b>ATCAACATCG</b>	<b>AAGGCCCTGA</b>	<b>AGCTAAAAATC</b>	<b>AAAGCACCCCT</b>	7380
←Primer 21_rev-----						
<b>CTTTAGTGGT</b>	<b>TCTGCTCCTC</b>	<b>AAGTCTCCAT</b>	<b>ACCCGATGAA</b>	<b>GCCGAATTCC</b>	<b>AGCACACTGG</b>	7440
<b>CGGCCGTTAC</b>	<b>TAGCCGTCGA</b>	<b>CGATCCGTCGA</b>	<b>GCAGTGTGG</b>	<b>TTTTGCAAGA</b>	<b>GGAAGCAAAA</b>	7500
NheI/SpeI      SalI      Start      Thymidinkinase      Kasette      (HSV-tk)						
<b>AGCCTCTCCA</b>	<b>CCCAGGCCTG</b>	<b>GAATGTTTCC</b>	<b>ACCCAATGTC</b>	<b>GAGCAGTGTG</b>	<b>GTTTTGCAAG</b>	7560
<b>AGGAAGCAAA</b>	<b>AAGCCTCTCC</b>	<b>ACCCAGGCCT</b>	<b>GGAATGTTTC</b>	<b>CACCCAATGT</b>	<b>CGAGCAAACC</b>	7620
<b>CCGCCCAGCG</b>	<b>TCTTGTCATT</b>	<b>GGCGAATTCG</b>	<b>AACACGCAGA</b>	<b>TGCAGTCGGG</b>	<b>GCGGCGCGGT</b>	7680
<b>CCGAGGTCCA</b>	<b>CTTCGCATAT</b>	<b>TAAGGTGACG</b>	<b>CGTGTGGCCT</b>	<b>CGAACACCGA</b>	<b>GCGACCCCTGC</b>	7740
<b>AGCGACCCGC</b>	<b>TTAACAGCGT</b>	<b>CAACAGCGTG</b>	<b>CCGCAGATCT</b>	<b>TGGTGGCGTG</b>	<b>AAACTCCCGC</b>	7800
<b>ACCTCTTCGG</b>	<b>CCAGCGCCTT</b>	<b>GTAGAAGCGC</b>	<b>GTATGGCTTC</b>	<b>GTACCCCGGC</b>	<b>CATCAACACG</b>	7860
<b>CGTCTGCGTT</b>	<b>CGACCAGGCT</b>	<b>GCGCGTTCTC</b>	<b>GCGGCCATAG</b>	<b>CAACCGACGT</b>	<b>ACGGCGTTGC</b>	7920
<b>GCCCTCGCCG</b>	<b>GCAGCAAGAA</b>	<b>GCCACGGAAG</b>	<b>TCCGCCCGGA</b>	<b>GCAGAAAATG</b>	<b>CCCACGCTAC</b>	7980
<b>TGCGGGTTTA</b>	<b>TATAGACGGT</b>	<b>CCCCACGGGA</b>	<b>TGGGGAAAAC</b>	<b>CACCACCACG</b>	<b>CAACTGCTGG</b>	8040
<b>TGGCCCTGGG</b>	<b>TTCGCGCGAC</b>	<b>GATATCGTCT</b>	<b>ACGTACCCGA</b>	<b>GCCGATGACT</b>	<b>TACTGGCGGG</b>	8100
EcoRV						
<b>TGCTGGGGGC</b>	<b>TTCCGAGACA</b>	<b>ATCGCGAACA</b>	<b>TCTACACCAC</b>	<b>ACAACACCGC</b>	<b>CTCGACCAGG</b>	8160
<b>GTGAGATATC</b>	<b>GGCCGGGGAC</b>	<b>GCGGCGGTGG</b>	<b>TAATGACAAG</b>	<b>CGCCCAGATA</b>	<b>ACAATGGGCA</b>	8220
<b>TGCCTTATGC</b>	<b>CGTGACCGAC</b>	<b>GCGGTTCTGG</b>	<b>CTCCTCATAT</b>	<b>CGGGGGGGAG</b>	<b>GCTGGGGGCT</b>	8280
SacI						
<b>CACATGCCCC</b>	<b>GCCCCCGGCC</b>	<b>CTCACCTCA</b>	<b>TCTTCGACCG</b>	<b>CCATCCCATC</b>	<b>GCCGCCCTCC</b>	8340
<b>TGTGCTACCC</b>	<b>GGCCGCGCGG</b>	<b>TACCTTATGG</b>	<b>GCAGCATGAC</b>	<b>CCCCCAGGCC</b>	<b>GTGCTGGCGT</b>	8400
<b>TCGTGGCCCT</b>	<b>CATCCCGCCC</b>	<b>ACCTTGCCCG</b>	<b>GCACCAACAT</b>	<b>CGTGCTTGGG</b>	<b>GCCCTTCCGG</b>	8460
<b>AGGACAGACA</b>	<b>CATCGACCGC</b>	<b>CTGGCCAAAC</b>	<b>GCCAGCGCCC</b>	<b>CGGCGAGCGG</b>	<b>CTGGACCTGG</b>	8520
<b>CTATGCTGGC</b>	<b>TGCGATTTCG</b>	<b>CGCGTTTACG</b>	<b>GGCTACTTGC</b>	<b>CAATACGGTG</b>	<b>CGGTATCTGC</b>	8580
<b>AGTGCGGCGG</b>	<b>GTCGTGGCGG</b>	<b>GAGGATCGGG</b>	<b>GACAGCTTTC</b>	<b>GGGGACGGCC</b>	<b>GTGCCGCCCC</b>	8640
<b>AGGGTGCCGA</b>	<b>GCCCCAGAGC</b>	<b>AACGCGGGCC</b>	<b>CACGACCCCA</b>	<b>TATCGGGGAC</b>	<b>ACGTTATTTA</b>	8700
<b>CCCTGTTTCG</b>	<b>GGCCCCGAG</b>	<b>TTGCTGGCCC</b>	<b>CCAACGGCGA</b>	<b>CCTGTATAAC</b>	<b>GTGTTTGCCCT</b>	8760
<b>GGGCCTTGGA</b>	<b>CGTCTTGGCC</b>	<b>AAACGCCTCC</b>	<b>GTTCCATGCA</b>	<b>CGTCTTTATC</b>	<b>CTGGATTACG</b>	8820
<b>ACCAATCGCC</b>	<b>CGCCGGCTGC</b>	<b>CGGGACGCCC</b>	<b>TGCTGCAACT</b>	<b>TACCTCCGGG</b>	<b>ATGGTCCAGA</b>	8880
<b>CCCACGTCAC</b>	<b>CACCCCCGGC</b>	<b>TCCATACCGA</b>	<b>CGATATGCGA</b>	<b>CCTGGCGCGC</b>	<b>ACGTTTGCCC</b>	8940
<b>GGGAGATGGG</b>	<b>GGAGGCTAAC</b>	<b>TGAAACACGG</b>	<b>AAGGAGACAA</b>	<b>TACCGGAAGG</b>	<b>AACCCGCGCT</b>	9000
<b>ATGACGGCAA</b>	<b>TAAAAAGACA</b>	<b>GAATAAAACG</b>	<b>CACGGGTGTT</b>	<b>GGGTGCTTTG</b>	<b>TTCATAAACG</b>	9060
<b>CGGGGTTCGG</b>	<b>TCCCAGGGCT</b>	<b>GGCACTCTGT</b>	<b>CGATACCCCA</b>	<b>CCGAGACCCC</b>	<b>ATTGGGGCCA</b>	9120
<b>ATACGCCCCG</b>	<b>GTTTCTTCCT</b>	<b>TTTCCCCACC</b>	<b>CCACCCCCCA</b>	<b>AGTTCGGGTG</b>	<b>AAGGCCCAGG</b>	9180
<b>GCTCGCAGCC</b>	<b>AACGTCGGGG</b>	<b>CGGCAGGCC</b>	<b>TGCCATAGCC</b>	<b>ACTGGCCCCG</b>	<b>TGGGTTAGGG</b>	9240
<b>ACGGGGTCCC</b>	<b>CCATGGGGAA</b>	<b>TGGTTTATGG</b>	<b>TTCGTGGGGG</b>	<b>TTATTATTTT</b>	<b>GGCGTTGCG</b>	9300
<b>TGGGGTCTGG</b>	<b>TGGACGACCC</b>	<b>AGCAAGCTTG</b>	<b>GCTGCAGGTC</b>	<b>GATCGACGCC</b>	<b>CGGGAATTCA</b>	9360
Ende der Tk Kasette      HindIII						
<b>CTGGCCGTCG</b>	<b>TTTTACAACG</b>	<b>TCGTGACTGG</b>	<b>GAAAACCCTG</b>	<b>GCGTTACCCA</b>	<b>ACTTAATCGC</b>	9420
<b>CTTGCAGCAC</b>	<b>ATCCCCCTTT</b>	<b>CGCCAGCTGG</b>	<b>CGTAATAGCG</b>	<b>AAGAGGCCCG</b>	<b>CACCGATCGC</b>	9480
<b>CCTTCCCAAC</b>	<b>AGTTGCGCAG</b>	<b>CCTGAATGGC</b>	<b>GAATGGCGCC</b>	<b>TGATGCGGTA</b>	<b>TTTTCTCCTT</b>	9540
<b>ACGCATCTGT</b>	<b>GCGGTATTTT</b>	<b>ACACCGCATA</b>	<b>TGGTGCATCT</b>	<b>TCAGTACAAT</b>	<b>CTGCTCTGAT</b>	9600
<b>GCCGCATAGT</b>	<b>TAAGCCAGCC</b>	<b>CCGACACCCG</b>	<b>CCAACACCCG</b>	<b>CTGACGCGCC</b>	<b>CTGACGGGCT</b>	9660
<b>TGTCTGCTCC</b>	<b>CGGCATCCGC</b>	<b>TTACAGACAA</b>	<b>GCTGTGACCG</b>	<b>TCTCCGGGAG</b>	<b>CTGCATGTGT</b>	9720
<b>CAGAGTTTTT</b>	<b>CACCGTCATC</b>	<b>ACCGAAACGC</b>	<b>GCGAGACGAA</b>	<b>AGGGCCTCGT</b>	<b>GATACGCCCTA</b>	9780
<b>TTTTTATAGG</b>	<b>TTAATGTCAT</b>	<b>GATAATAATG</b>	<b>GTTTCTTAGA</b>	<b>CGTCAGGTGG</b>	<b>CACTTTTTCGG</b>	9840
<b>GGAAATGTGC</b>	<b>GCGGAACCCC</b>	<b>TATTTGTTTTA</b>	<b>TTTTTCTAAA</b>	<b>TACATTCAAA</b>	<b>TATGTATCCG</b>	9900
<b>CTCATGAGAC</b>	<b>AATAACCCTG</b>	<b>ATAAATGCTT</b>	<b>CAATAATATT</b>	<b>GAAAAAGGAA</b>	<b>GAGTATGAGT</b>	9960
<b>ATTCAACATT</b>	<b>TCCGTGTCGC</b>	<b>CCTTATTCCC</b>	<b>TTTTTTGCGG</b>	<b>CATTTTGCCT</b>	<b>TCCTGTTTTT</b>	10020
<b>GCTCACCAG</b>	<b>AAACGCTGGT</b>	<b>GAAAGTAAAA</b>	<b>GATGCTGAAG</b>	<b>ATCAGTTGGG</b>	<b>TGCACGAGTG</b>	10080
<b>GGTTACATCG</b>	<b>AACTGGATCT</b>	<b>CAACAGCGGT</b>	<b>AAGATCCTTG</b>	<b>AGAGTTTTTCG</b>	<b>CCCCGAAGAA</b>	10140
<b>CGTTTTCCAA</b>	<b>TGATGAGCAC</b>	<b>TTTTAAAGTT</b>	<b>CTGCTATGTG</b>	<b>GCGCGGTATT</b>	<b>ATCCCGTATT</b>	10200

GACGCCGGGC	AAGAGCAACT	CGGTCGCCGC	ATACACTATT	CTCAGAATGA	CTTGTTGAG	10260
TACTCACCAG	TCACAGAAAA	GCATCTTACG	GATGGCATGA	CAGTAAGAGA	ATTATGCAGT	10320
GCTGCCATAA	CCATGAGTGA	TAACACTGCG	GCCAACTTAC	TTCTGACAAC	GATCGGAGGA	10380
CCGAAGGAGC	TAACCGCTTT	TTTGCACAAC	ATGGGGGATC	ATGTAACTCG	CCTTGATCGT	10440
TCCCAACCCC	ACCTCAATGA	AGGGATACCA	AACGACGAGC	GTGACACCAC	GATGCCTGTA	10500
GCAATGGCAA	CAACGTTGCG	CAAACATTA	ACTGGCGAAC	TACTTACTCT	AGCTTCCCGG	10560
CAACAATTAA	TAGACTGGAT	GGAGGCGGAT	AAAGTTGCAG	GACCACTTCT	GCGCTCGGCC	10620
CTTCCGGCTG	GCTGGTTTAT	TGCTGATAAA	TCTGGAGCCG	GTGAGCGTGG	GTCTCGCGGT	10680
ATCATTGCAG	CACTGGGGCC	AGATGGTAAG	CCCTCCCGTA	TCGTAGTTAT	CTACACGACG	10740
GGGAGTCAGG	CAACTATGGA	TGAACGAAAT	AGACAGATCG	CTGAGATAGG	TGCCTCACTG	10800
ATTAAGCATT	GGTAACTGTC	AGACCAAGTT	TACTCATATA	TACTTTAGAT	TGATTTAAAA	10860
CTTCATTTTT	AATTTAAAAG	GATCTAGGTG	AAGATCCTTT	TTGATAATCT	CATGACCAAA	10920
ATCCCTTAAC	GTGAGTTTTT	GTTCCACTGA	GCGTCAGACC	CCGTAGAAAA	GATCAAAGGA	10980
TCTTCTTGAG	ATCCTTTTTT	TCTGCGCGTA	ATCTGCTGCT	TGCAAACAAA	AAAACCACCG	11040
CTACCAGCGG	TGGTTTGT	GCCGGATCAA	GAGCTACCAA	CTCTTTTTCC	GAAGGTAAC	11100
GGCTTCAGCA	GAGCGCAGAT	ACCAAATACT	GTCCTTCTAG	TGTAGCCGTA	GTTAGGCCAC	11160
CACTTCAAGA	ACTCTGTAGC	ACCGCCTACA	TACCTCGCTC	TGCTAATCCT	GTTACCAGTG	11220
GGTGCTGCCA	GTGGCCATAA	GTCGTGTCTT	ACCGGGTTGG	ACTCAAGACG	ATAGTTACCG	11280
GATAAGGCGC	AGCGGTCGGG	CTGAACGGGG	GGTTCGTGCA	CACAGCCCAG	CTTGAGCGA	11340
ACGACCTACA	CCGAACGAG	ATACCTACAG	CGTGAGCTAT	GAGAAAGCGC	CACGCTTCCC	11400
GAAGGGAGAA	AGGCGGACAG	GTATCCGGTA	AGCGGCAGGG	TCGGAACAGG	AGAGCGCACG	11460
AGGGAGCTTC	CAGGGGGA	CGCCTGGTAT	CTTTATAGTC	CTGTGGGGTT	TCGCCACCTC	11520
TGACTTGAGC	GTCGATTTTT	GTGATGCTCG	TCAGGGGGGC	GGAGCCTATG	GAAAAACGCC	11580
AGCAACGCGG	CCTTTTTTACG	GTTCTTGCC	TTTTGCTGGC	CTTTTGCTCA	CATGTTCTTT	11640
CCTGCGTTAT	CCCCTGATTC	TGTGGATAAC	CGTATTACCG	CCTTTGAGTG	AGCTGATACC	11700
GCTCGCCGCA	GCCGAACGAC	CGAGCGCAGC	GAGTCAGTGA	GCGAGGAAGC	GGAAGAGCGC	11760
CCAATACGCA	AACCGCCTCT	CCCCGCGCGT	TGGCCGATTC	ATTAATGCAG	CTGGCACGAC	11820
AGGTTTCCCG	ACTGGAAAGC	GGGCAGTGAG	CGCAACGCAA	TTAATGTGAG	TTAGCTCACT	11880
CATTAGGCAC	CCCAGGCTTT	ACACTTTATG	CTTCCGGCTC	GTATGTTGTG	TGGAATTGTG	11940
AGCGGATAAC	AATTTACAC	AGGAAACAGC	TATTGACCAT	GATTACGAAT	TC	11992

Abb. 7.8: Gesamte Sequenz des Targetvektors. Der N-terminale Bereich des Ahnak-Gens (5'-Homologieregion, 27-1026 bp) ist fett markiert. Die 3'-Homologieregion des Ahnak-Gens (2183-7368 bp) ist fett und kursiv gekennzeichnet. Die Neomycin-Resistenz-Kassette, sowie die Thymidin-kinase-Kassette (HSV-*tk*) sind grau unterlegt. Die verwendeten Restriktions-schnittstellen wurden unterstrichen (\_\_\_), auch die Primer (\_\_\_\_). Die Primer wurden zusätzlich mit Pfeilen gekennzeichnet, die angeben, ob es sich um einen Vorwärts- oder um einen Rückwärts-Primer handelt.

MSPILGYWKIKGLVQPTLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEF	
PNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAESI SMLEGAVIDIR	
YGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNDHVTHPDFML	
YDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGW	
QATFGGGDHPKSDLVPRGSPEFP	
	EGPDAKLSGPSLKMPSLEISAPKVTA 4671
PDVDLHLKAPKIGFSGPKLEGGEVDLKGPKVEAPSLDVHMDSPDINIEGPD	4722
VKIPKFKKPKFGFGPKSPKADIKSPSLDVTVP AEALNLETPEISVGKGKK	4773
SKFKMPKIHMSGPKIKAKKQGF DLNVPGEIDASLKAPDVDVNIAGPDAAL	4824
KVDVKS PKTKKTMFGKMYFPDVEFDIKSPKFKA EAPLPSPKLEGELQAPDL	4875
ELSLPAIHVEGLDIKAKAPKVKMPDVIDSVPKIEGDLKGPKVQANLGAPDI	4926
NIEGLDAKVKTPSFGISAPQVSIPDVNVNLKGPKIKGDVPSVGLEGPDVDL	4977
QGPEAKIKFPKFSMPKIGIPGVKMEGGGA EVHAQLPSLEGDLRGPDVKLEG	5028
PDVSLKGPGVDLPSVNLSPKVS GPDLDLNLKGPSLKGDL DASVPSMKVHA	5079
PGLNLSGVGGKMQVGGDGVKVPGIDATTKLNVGAPDVTLRGPSLQGD LAVS	5130
GDIKCPKVS VGAPDLSLEASEGSIKLPKMKLPQFGISTPGSDLHVNAKGPQ	5181
VSGELKGPGVDVNLKGSRI SAPNVDFNLEGPKVKGSLGATGEIKGPTVGGG	5232
LPGIGVQGLEGNLQMPGIKSSGCDVNLPGVNVKLPTGQISGPEIKGGLKGS	5283
EVGFH	5288
VERPHRD*	

Abb. 7.9: Aminosäuresequenz von dem C-terminalen Ahnak-Fragment Ahnak-C1 im GST-Expressionsvektor, pGEX-4T1 (Amersham, Pharmacia, Deutschland). Der GST-Expressionsvektor ist fett markiert. Das Ahnak-C1-Fragment ist normal und die Mutation von Isoleuzin zu Threonin fett und kursiv, gedruckt. Die Zahlen geben die Aminosäureposition von Ahnak-C1 an.

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGS	
	KGSLGATGEIKG 5226
PTVGGGLPGIGVQGLEGNLQMPGIKSSGCDVNLPGVNVKLPTGQISGP	5274
EIKGGLKGSEVGFH	5288
VKLDPAANKARKEAEFGCCHR	

Abb. 7.10: Aminosäuresequenz vom C-terminalen Ahnak-Fragment Ahnak-5215-88\_wt im His-Tag-Fusionsvektor, pRSET A (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Der His-Tag-Fusionsvektor pRSET A ist fett markiert. Das Ahnak-5215-88\_wt Fragment ist normal und die Mutation von Isoleuzin zu Threonin ist fett und kursiv gedruckt. Die Zahlen geben die Aminosäureposition des Ahnak-5215-88 Fragment an.



MSPILGYWKIKGLVQPTLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEF	
PNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIR	
YGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNDHVTHPDFML	
YDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGW	
QATFGGGDHPPKSDLVPRGSPEFP	
SEVKLKKSKIKMPKFNFSPKPKGGVT	5505
GSPEASISGSKGDLKSSKASLGSLEGEAEAEASSPKGKFSLFKSKKPRHRS	5532
NSFSDEREFSG <b>PSTPT</b> GTLEFEGGEVSLEGGKVKGKHGKLKFGTFGGLGSK	5583
SKGHYEVTGSDDDETGKLQSGSVSLASKKSRLSSSSSNDSGNKVGIQLPEVE	5634
LSVSTKKE	5643
<b>VERPHRD*</b>	

Abb: 7.11: Aminosäuresequenz vom C-terminalen Ahnak-Fragment P3-P4, im GST-Expressionsvektor, pGEX-4T1 (Amersham, Pharmacia, Deutschland). Der GST-Expressionsvektor ist fett gedruckt. Die Mutation von Threonin zu Methionin ist fett und kursiv dargestellt. Das PxxP-Motiv ist fett gedruckt.

---

## Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Ingo Morano für die nette Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas und die kritische Durchsicht meiner Arbeit besonders danken.

Herrn Prof. Dr. Andreas Herrmann (Molekulare Biophysik) von der Humboldt-Universität zu Berlin danke ich für die offizielle Betreuung meiner Arbeit.

Ein ganz spezielles Dankeschön an Frau Dr. Hannelore Haase, die dieses Projekt eingeworben und mir damit die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Thema zu arbeiten. Außerdem danke ich ihr für die fachlichen Diskussionen zu jeder Zeit, das große Verständnis bei jedem Problem und die angenehme und zeitweilig sehr unterhaltsame Zusammenarbeit während der gesamten Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Michael Bader (Max-Delbrück-Centrum, Berlin-Buch, Molekularbiologie von Hormonen im Herz-Kreislaufsystem) danke ich für die gute Beratung und Tipps beim Klonieren.

Für die sehr nette Zusammenarbeit und dafür, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, danke ich meinen Kollegen: Christiane Woischwill, Dr. Holger Bartsch und Dr. Annette Hohaus.

Unseren technischen Assistenten: Steffen Lutter, Wolfgang-Peter Schlegel und Petra Pierschalek danke ich für ihre kompetente und vor allem tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit. Ich danke auch unseren Tierpflegern vom MDC, die dafür gesorgt haben, dass es meinen Versuchstieren an nichts fehlte.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden bedanken, die jedes fehlende Leerzeichen aufspürten, mich in endlosen Gesprächen immer wieder zu motivieren wussten, mich mit Kaffee und Kuchen versorgten oder mir einfach nur den Rücken frei hielten.

Ein ganz besonders dickes Dankeschön an die tollste Familie die ich habe. An meine Eltern, die immer an mich geglaubt und mich in allem was ich tun wollte unterstützt haben und ohne die ich heute nicht da wäre, wo ich bin. Und an meine Schwester, bei der ich immer zu Hause einfallen konnte, wenn mir die Decke auf den Kopf fiel.

---

## Lebenslauf

20.01.1972	in Hamburg geboren
1978 - 1982	Schülerin der Grundschule Bünningstedt
1982 - 1988	Schülerin der 5.-10. Klasse am Kreisgymnasium in Bargteheide
08.1988 - 07.1989	USA-Aufenthalt; Austauschschülerin an der Helena-Highschool in Helena, Montana
08.1989 - 06.1992	Schülerin der 11.-13. Klasse am Kreisgymnasium Bargteheide, Abschluss: Abitur
10.1992 - 03.1995	Studentin der Biologie/Dipl. an der Universität Rostock, Abschluss: Vordiplom
04.1995 - 03.2000	Studentin an der Humboldt Universität zu Berlin mit Abschluss des Diploms für Biologie, Gesamtnote: gut (1,8)
15.08.2000 – 31.07.2007	Doktorandin in der Arbeitsgruppe: Molekulare Muskelphysiologie am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), Berlin-Buch

---

## Publikationen

- Petzhold, D., M. Bader, H. Bartsch, A. Hohaus, I. Morano and H. Haase (2003). Mouse Ahnak (desmoyokin) homologues to human ahnak, NCBI Data base. **AY367634**.
- Petzhold, D., M. Bader, H. Bartsch, A. Hohaus, I. Morano and H. Haase (2003). Mus musculus Ahnak (Desmoyokin) Homologues to Homo sapiens ahnak (C-Terminus), NCBI Data base. **AY369977**.
- Abdelaziz, A. I., J. Segaric, H. Bartsch, D. Petzhold, W. P. Schlegel, M. Kott, I. Seefeldt, J. Klose, M. Bader, H. Haase and I. Morano (2004). "Functional characterization of the human atrial essential myosin light chain (hALC-1) in a transgenic rat model." J Mol Med **82**(4): 265-74.
- Haase, H., I. Pagel, Y. Khalina, U. Zacharzowsky, V. Person, G. Lutsch, D. Petzhold, M. Kott, J. Schaper and I. Morano (2004). "The carboxyl-terminal ahnak domain induces actin bundling and stabilizes muscle contraction." Faseb J **18**(7): 839-41.
- Haase, H., J. Alvarez, D. Petzhold, A. Doller, J. Behlke, J. Erdmann, R. Hetzer, V. Regitz-Zagrosek, G. Vassort and I. Morano (2005). "Ahnak is critical for cardiac Ca(V)1.2 calcium channel function and its beta-adrenergic regulation." Faseb J **19**(14): 1969-77.
- Khalina, Y. N., H. Bartsch, D. Petzhold, H. Haase, Z. A. Podlubnaya, M. D. Shpagina and I. Morano (2005). "Reconstitution of ventricular myosin with atrial light chains 1 improves its functional properties." Acta Biochim Pol **52**(2): 443-8.
- Patzak, A., D. Petzhold, T. Wronski, P. Martinka, G. J. Babu, M. Periasamy, H. Haase and I. Morano (2005). "Constriction velocities of renal afferent and efferent arterioles of mice are not related to SMB expression." Kidney Int **68**(6): 2726-34.
- Haase, H., G. Dobbernack, G. Tunnemann, P. Karczewski, C. Cardoso, D. Petzhold, W. P. Schlegel, S. Lutter, P. Pierschalek, J. Behlke and I. Morano (2006). "Minigenes encoding N-terminal domains of human cardiac myosin light chain-1 improve heart function of transgenic rats." Faseb J **20**(7): 865-73.

---

## **Erklärung**

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom August 2000 bis März 2007 in der Arbeitsgruppe Molekulare Muskelphysiologie, von Prof. Dr. Ingo Morano, am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), in Berlin-Buch angefertigt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und verfasst habe. Es wurden ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel verwendet. Literaturquellen sind als solche gekennzeichnet.  
Berlin, 26.03.2007